

## **QBQ0204 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo**

### **Guia de estudos**

#### ***Aula 13: Ciclo de Krebs e Metabolismo do Glicogênio***

Para esta aula estamos incluindo também uma leitura básica sobre glicólise, mais simples que a leitura básica da aula anterior. Focaremos no uso do livro de Bioquímica Básica nessa parte sobre metabolismo. Contudo, também colocaremos o material avançado (Lehninger) para quem quiser se aprofundar. Portanto, as leituras não estão marcadas no texto, mas os capítulos referentes ao livro de Bioquímica Básica (as primeiras na ordem que aparece) são leituras básicas, e os capítulos seguintes (Lehninger) são leituras avançadas.

# 9

# Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA

## 9.1 Oxidação de glicose

A glicose é, quantitativamente, o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos. Sua utilização como fonte de energia pode ser considerada universal e, dos microrganismos aos seres humanos, quase todas as células são capazes de atender a suas demandas energéticas apenas a partir deste açúcar. Para algumas células e órgãos, como hemácias e cérebro, a glicose é imprescindível, por ser o único substrato a partir do qual podem sintetizar ATP.

Apesar de a dieta humana conter pouca glicose livre, quantidades consideráveis deste açúcar são ingeridas sob a forma de amido, sacarose e lactose. Nas dietas mais comuns, 55% dos carboidratos aparecem como amido, 35% como sacarose, 5% como lactose e 5% como glicose e outros monossacarídeos. O amido é digerido no trato digestório até glicose, o açúcar que será afinal absorvido e distribuído para os tecidos. A digestão de sacarose e lactose origina, além de glicose, frutose e galactose. A parte inicial da oxidação da glicose está descrita nas seções seguintes; o metabolismo dos outros açúcares encontra-se na Seção 13.3.

### **A oxidação de glicose a piruvato permite obter ATP; a oxidação do piruvato a CO<sub>2</sub> aumenta muito a produção de ATP**

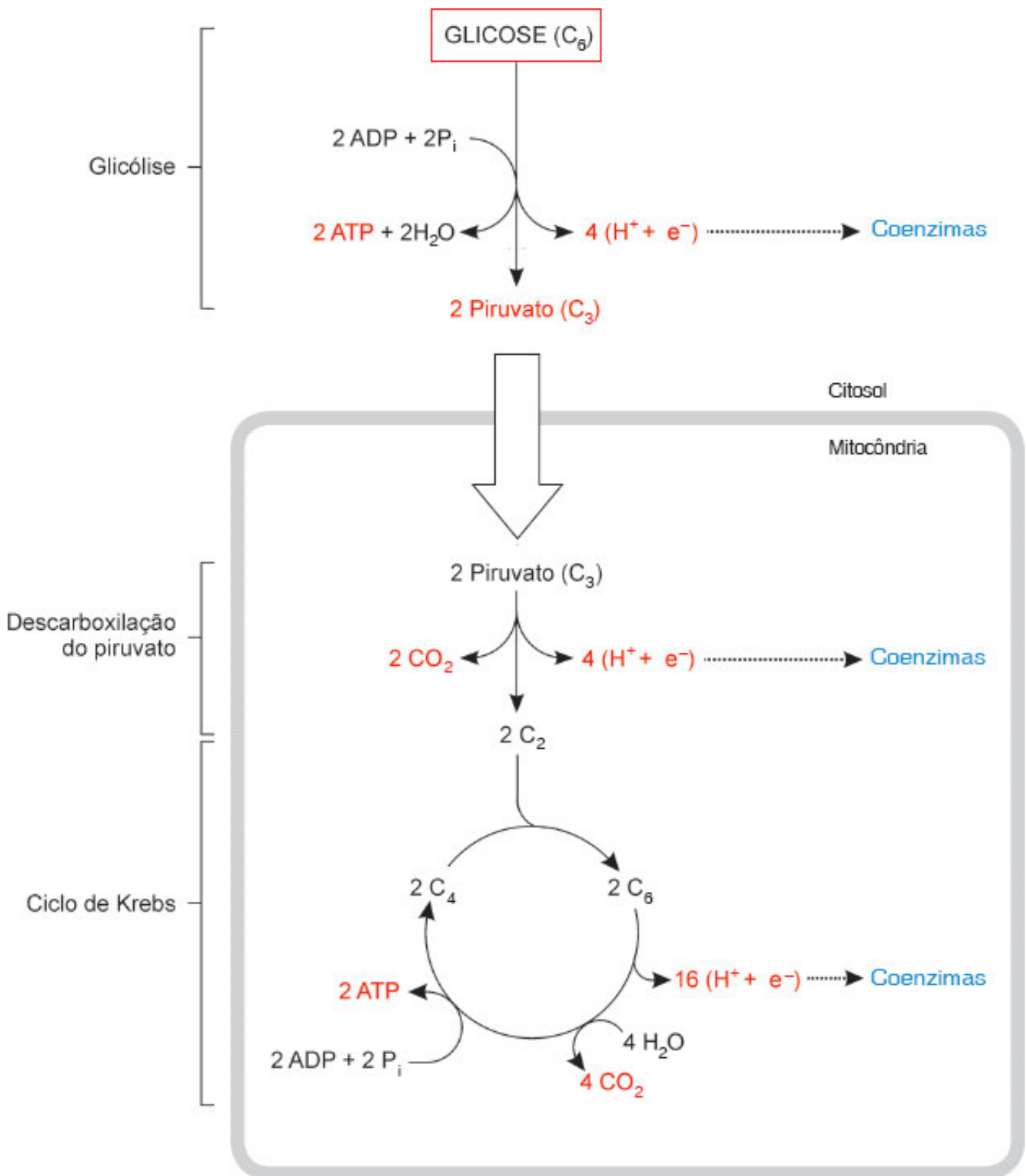
A oxidação total da glicose é um processo exergônico, que libera uma quantidade de energia equivalente a  $2.870 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Nas células, esta transformação é estritamente acoplada à síntese de ATP a partir de ADP e  $P_i$ , um processo endergônico ( $\Delta G^\circ = +31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). A glicose constitui, então, uma fonte de energia livre, que pode ser conservada como ATP, a principal forma de energia utilizável pelos seres vivos.

A oxidação anaeróbia de glicose a piruvato rende apenas uma pequena parcela — menos de 10% — do total de ATP obtido pela oxidação aeróbia de glicose. Ainda assim, os organismos e as células anaeróbios conseguem suprir, com este processo, toda a sua demanda energética. Nas células aeróbias, o piruvato pode ser totalmente oxidado, trazendo um enorme ganho na formação de ATP.

Um esquema geral da oxidação completa de glicose, até  $\text{CO}_2$ , está mostrado na Figura 9.1. A etapa inicial, que se processa no citosol, consiste na conversão de uma molécula de glicose ( $\text{C}_6$ ) a duas moléculas de piruvato ( $2 \text{ C}_3$ ) por meio de uma sequência de reações denominada *glicólise*, uma via metabólica encontrada em praticamente todos os seres vivos. Seus produtos são, além das duas moléculas de piruvato, ATP e prótons e elétrons ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ), que são recebidos por coenzimas.

A posterior oxidação do piruvato é feita no interior da mitocôndria, nas células que dispõem desta organela. Na mitocôndria, o piruvato sofre uma descarboxilação, transformando-se em um composto com dois carbonos ( $\text{C}_2$ ). Este combina-se com um composto de quatro carbonos ( $\text{C}_4$ ), formando um composto de seis carbonos ( $\text{C}_6$ ). Por meio de uma sequência cíclica de reações (ciclo de Krebs),  $\text{C}_6$  perde dois carbonos sob a forma de  $\text{CO}_2$  e regenera  $\text{C}_4$ .

A oxidação do piruvato a  $\text{CO}_2$  é acompanhada da produção de grande quantidade de prótons e elétrons ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ), sempre recebidos por coenzimas. Da oxidação destas coenzimas pelo oxigênio na cadeia respiratória (Seções 11.1 e 11.2), deriva-se a grande produção de ATP conseguida pela oxidação do piruvato e que perfaz cerca de 90% do total obtido com a oxidação completa da glicose.

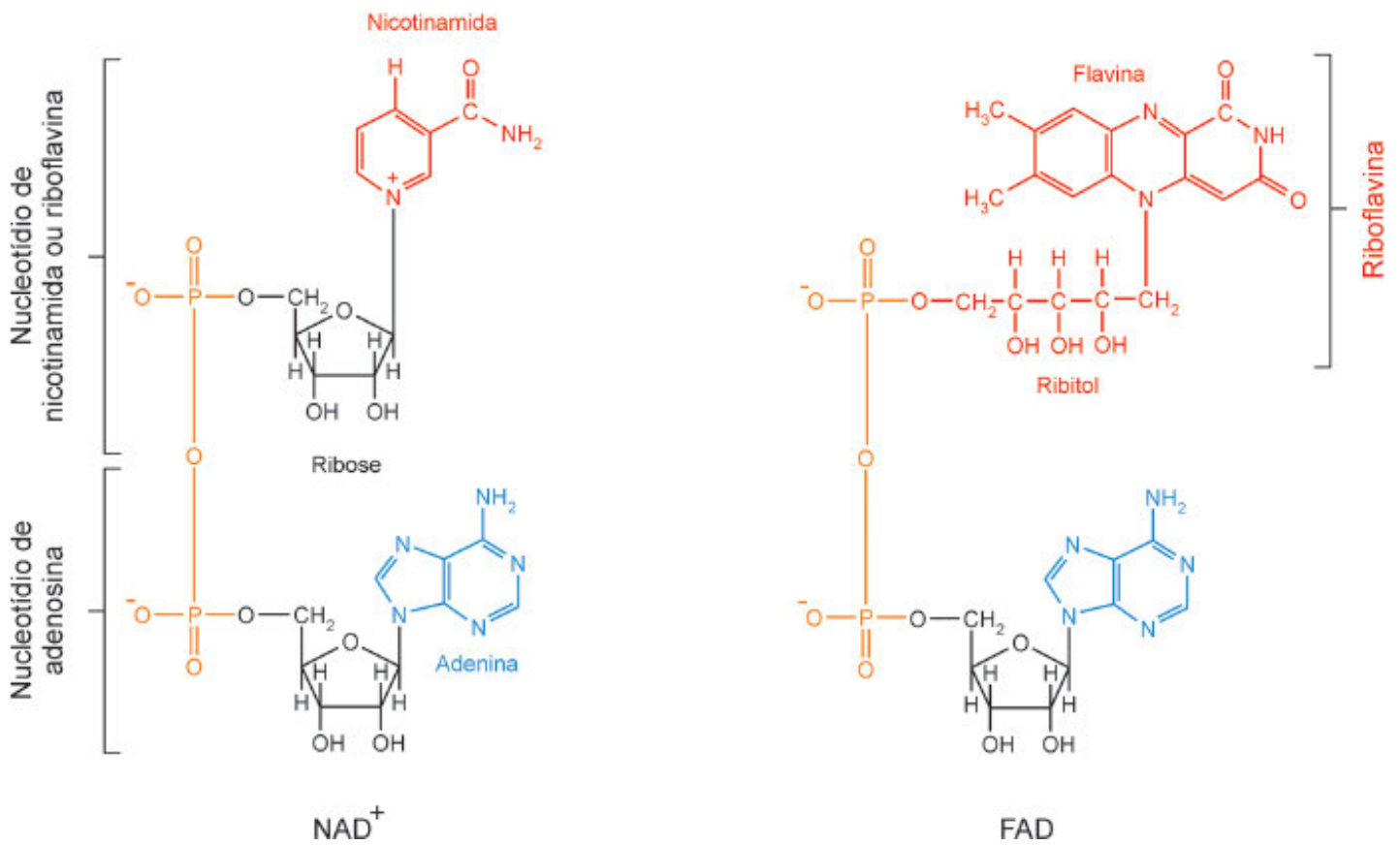


**Figura 9.1** Esquema da oxidação completa da glicose. No citosol, a glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato que, na mitocôndria, são oxidadas a  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}_2$  e os outros produtos da oxidação da glicose estão destacados em vermelho. Os prótons e elétrons ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ) são incorporados por coenzimas.

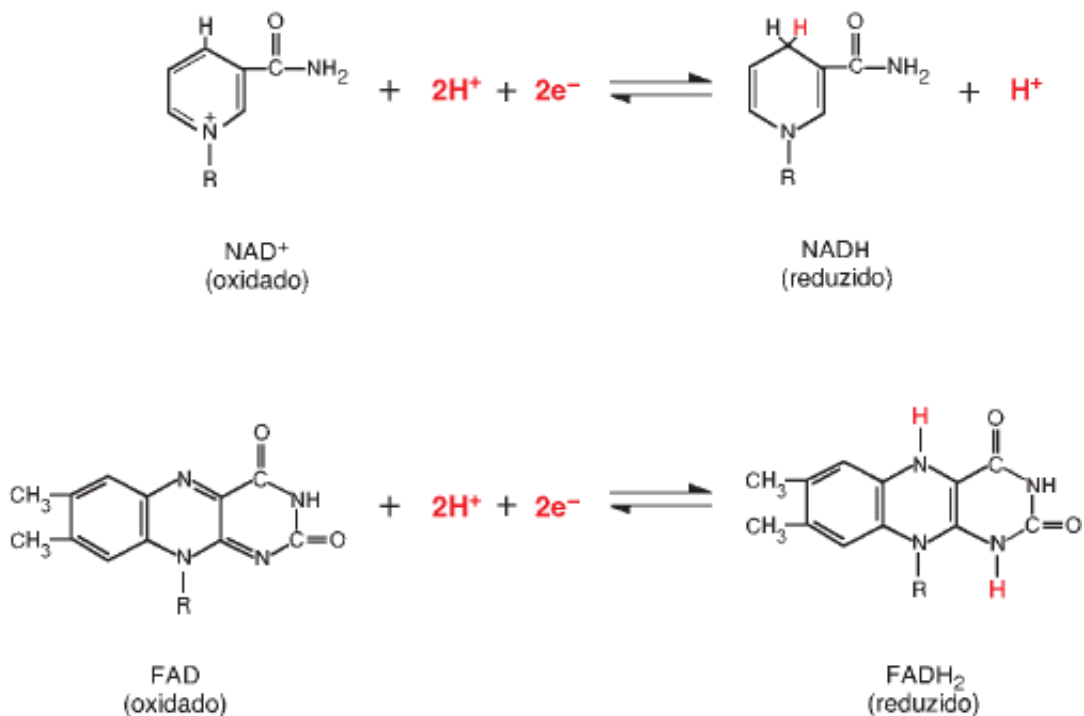
### As coenzimas que recebem os ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ) produzidos na oxidação da glicose são $\text{NAD}^+$ e $\text{FAD}$

Nas três etapas da oxidação da glicose — glicólise, descarboxilação do piruvato e ciclo de Krebs — os ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ) são produzidos em reações catalisadas por desidrogenases. Algumas desidrogenases utilizam como coenzima a *nicotinamida adenina dinucleotídio* ( $\text{NAD}^+$ ), e outras, a *flavina adenina dinucleotídio* ( $\text{FAD}$ ) (Figura 9.2), derivadas, respectivamente, das vitaminas nicotinamida ( $\text{B}_3$ ) e riboflavina ( $\text{B}_2$ ).  $\text{FAD}$ , diferentemente de  $\text{NAD}^+$ , liga-se covalentemente à molécula proteica, consistindo em um grupo prostético. As proteínas que contêm coenzimas provenientes de riboflavina ( $\text{FAD}$  ou  $\text{FMN}$  — Seção 11.2) são designadas *flavoproteínas*.

Nas reações com participação de  $\text{NAD}^+$ , há transferência de dois elétrons e um próton do substrato para o  $\text{NAD}^+$ , que se reduz a  $\text{NADH}$ ; o outro próton é liberado no meio. Já o  $\text{FAD}$  recebe dois elétrons e dois prótons, reduzindo-se a  $\text{FADH}_2$  (Figura 9.3).



**Figura 9.2** Estrutura das formas oxidadas da nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD<sup>+</sup>) e da flavina adenina dinucleotídio (FAD). Cada nucleotídio é formado por uma base nitrogenada cíclica (nicotinamida, flavina ou adenina), uma ribose (ou o poliálcool ribitol) e um grupo fosfato. As vitaminas componentes das coenzimas estão destacadas em vermelho.



**Figura 9.3** Modelos de reações de oxidação-redução catalisadas por desidrogenases que têm NAD<sup>+</sup> e FAD como coenzimas. O substrato reduzido (SH<sub>2</sub>) é oxidado, perdendo dois átomos de hidrogênio, e as coenzimas convertem-se às suas formas reduzidas. O NAD<sup>+</sup> recebe dois elétrons e um próton, ficando o segundo próton no meio; o FAD recebe os dois átomos de hidrogênio. Estão

representadas apenas as partes reativas do  $\text{NAD}^+$  e  $\text{FAD}$ , o restante das moléculas sendo simbolizado por R.

## 9.2 Glicólise: oxidação de glicose a piruvato

A glicólise pode ser dividida em etapas correspondentes a seus eventos fundamentais (Figura 9.4):

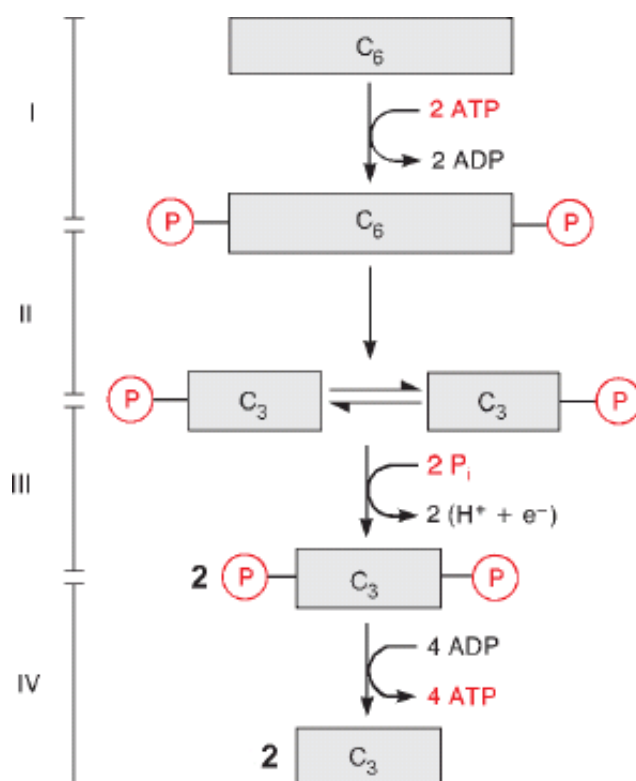
- I. Dupla fosforilação da glicose, à custa de 2 ATP, originando uma outra hexose, a frutose, com dois grupos fosfato.
- II. Clivagem da frutose, produzindo duas trioses fosforiladas, que são interconvertíveis.
- III. Oxidação e nova fosforilação das trioses fosfato, desta vez por fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ), formando duas moléculas de um intermediário bifosforilado.
- IV. Transferência dos grupos fosfato deste intermediário para 4 ADP, formando 4 ATP e 2 piruvato.

As quatro etapas são cumpridas em 10 reações sequenciais que compõem a glicólise (Figura 9.5).

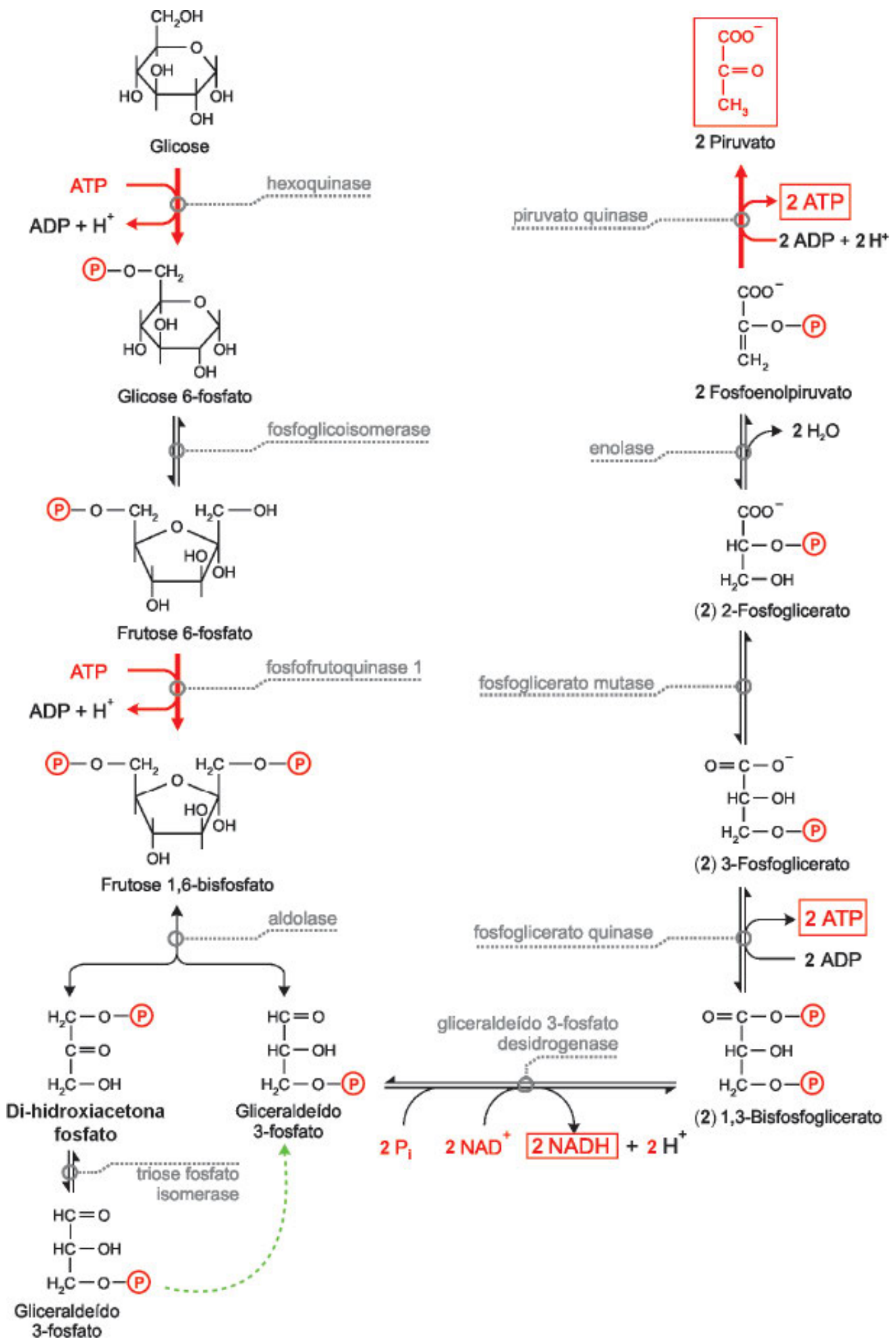
**Etapa I.** A primeira reação da glicólise é a conversão de glicose a glicose 6-fosfato. A glicose 6-fosfato, ao contrário da glicose, é incapaz de atravessar a membrana plasmática, o que garante a sua permanência dentro das células. A fosforilação da glicose a partir de glicose e fosfato inorgânico é uma reação inviável, por ter  $\Delta G^{\circ}$  positivo (Capítulo 4). Por isto, os organismos utilizam outra reação, que tem  $\Delta G^{\circ}$  negativo, e na qual o ATP é o doador de grupo fosfato. Esta reação é irreversível e catalisada por *hexoquinases*. As hexoquinases compõem uma família de enzimas ubíquas, que atuam sobre diversas hexoses. Nos tecidos de vertebrados, são encontradas quatro isoenzimas de hexoquinases, denominadas I a IV, que diferem por suas propriedades catalíticas, reguladoras, pela distribuição tecidual e localização intracelular. A hexoquinase IV é a isoenzima predominante em hepatócitos e células  $\beta$  do pâncreas; é comumente chamada de *glicoquinase*, embora não seja específica para glicose, podendo atuar com menor afinidade sobre outras hexoses.

Segue-se a isomerização da glicose 6-fosfato a frutose 6-fosfato, por ação da *fosfoglicoisomerase*, e nova fosforilação, análoga à anterior, também utilizando ATP e também irreversível, catalisada pela *fosfofrutoquinase 1 (6-fosfofruto-1-quinase)*. Forma-se, então, uma hexose com dois grupos fosfato: a frutose 1,6-bisfosfato<sup>1</sup>.

**Etapa II.** A frutose 1,6-bisfosfato é clivada em duas trioses isômeras, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, por ação da *aldolase*. O gliceraldeído 3-fosfato é o substrato da próxima enzima da via glicolítica, mas as duas trioses fosforiladas são interconvertidas por ação da *triose fosfato isomerase*. A conversão de di-hidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato possibilita que uma molécula de glicose ( $\text{C}_6$ ) seja convertida em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato ( $2 \times \text{C}_3$ ). Da reação da *triose fosfato isomerase* em diante, a via tem todos os seus intermediários duplicados e todos os carbonos da glicose são convertidos em piruvato.



**Figura 9.4** Etapas fundamentais da glicólise. O símbolo  $\text{P}$  representa o grupo  $\text{PO}_3^{2-}$ ;  $\text{C}_6$  indica hexose e  $\text{C}_3$ , triose.  $\text{P}_i$  = fosfato inorgânico ( $\text{HPO}_4^{2-}$  a pH 7,4).



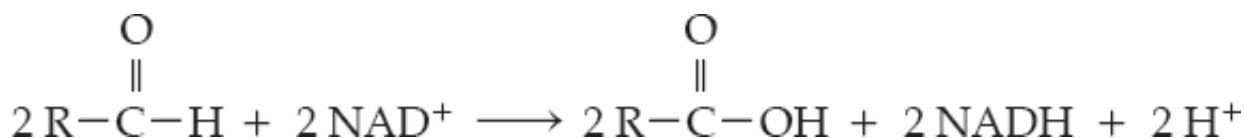
**Figura 9.5** Via glicolítica. Deve-se notar que a di-hidroxiacetona fosfato converte-se a gliceraldeído 3-fosfato, que prossegue a via glicolítica (seta verde tracejada). A partir de uma molécula de glicose formam-se **duas** moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, que originam **2 NADH**, **4 ATP** e **2 piruvato**. As setas vermelhas indicam reações irreversíveis.

A clivagem de frutose 1,6-bisfosfato e a isomerização de di-hidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato são

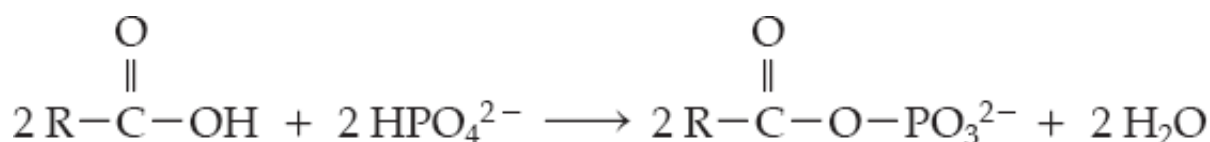
reações com  $\Delta G^{\circ}$  positivo. Isto significa que, nos respectivos equilíbrios, predominam frutose 1,6-bisfosfato e di-hidroxiacetona fosfato, respectivamente. Apesar disto, as duas reações processam-se no sentido da formação de gliceraldeído 3-fosfato, porque a retirada contínua deste composto pelas reações subsequentes torna negativo o sinal de  $\Delta G'$  das duas reações com  $\Delta G^{\circ}$  positivo.

**Etapa III.** As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato obtidas por fosforilação à custa de 2 ATP são oxidadas e novamente fosforiladas, agora por fosfato inorgânico, formando duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato. Este composto é um anidrido misto de um ácido carboxílico e o ácido fosfórico, um anidrido carboxílico-fosfórico, que é um composto rico em energia (Tabela 4.4, Seção 4.1). Trata-se de uma reação de oxidação-redução/fosforilação complexa, catalisada pela *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*. Para facilitar a compreensão, a reação pode ser desmembrada em duas reações parciais:

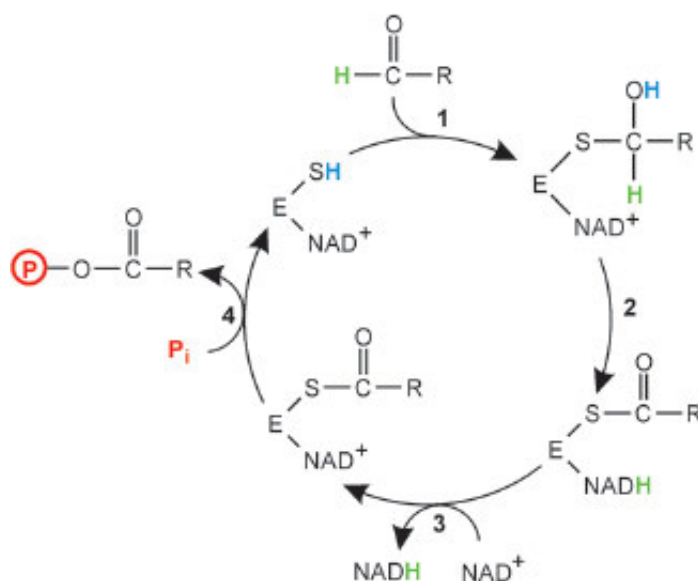
1. oxidação do aldeído (gliceraldeído 3-fosfato) a ácido carboxílico, com redução de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ , que é termodinamicamente favorável:



2. ligação do ácido carboxílico com o ácido fosfórico ( $\text{HPO}_4^{2-}$  a pH 7,4), formando um anidrido carboxílico-fosfórico, que é endergônica:



Na realidade, as duas reações ocorrem acopladas, permitindo que parte da energia livre da reação de oxidação do aldeído seja conservada na formação do anidrido carboxílico-fosfórico. O acoplamento é efetuado por um intermediário tioéster, rico em energia, resultante da oxidação do aldeído, que fica ligado à enzima. O mecanismo de ação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase está esquematizado na Figura 9.6. O gliceraldeído 3-fosfato reage com o grupo sulfidrila de um resíduo de cisteína do centro ativo da enzima (reação 1 na figura), formando-se um tio-hemiacetal<sup>2</sup>; segue-se a oxidação do tio-hemiacetal e a redução de um  $\text{NAD}^+$  ligado à enzima, formando o intermediário tioéster (reação 2); o  $\text{NADH}$  ligado à enzima é trocado por uma molécula livre de  $\text{NAD}^+$  (reação 3); o intermediário tioéster reage com fosfato inorgânico, formando 1,3-bisfosfoglicerato e regenerando o grupo SH da enzima (reação 4). A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é inibida por agentes específicos para grupos SH como o iodoacetato (Seção 5.7).

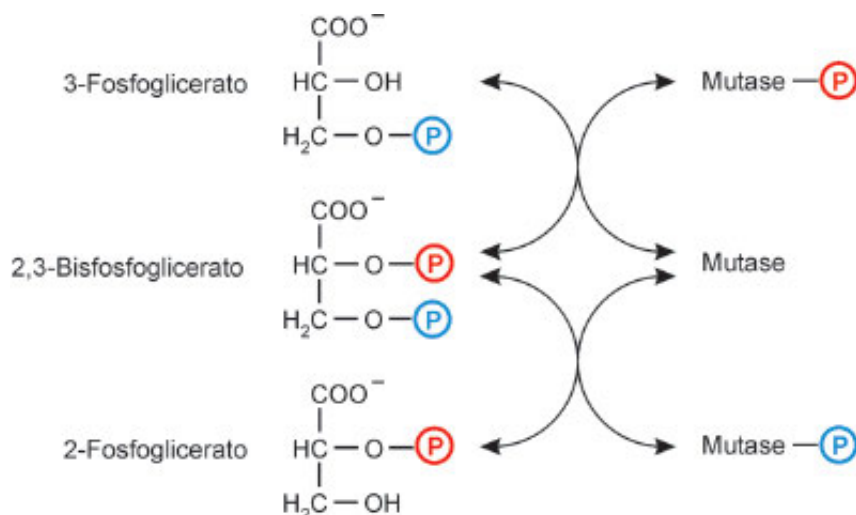


**Figura 9.6** Esquema da conversão de gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. As reações 1 a 4 estão descritas no texto.  $\text{P}_i$  = fosfato inorgânico ( $\text{HPO}_4^{2-}$  a pH 7,4);  $\text{P}$  =  $\text{PO}_3^{2-}$ .

**Etapa IV.** Compreende dois eventos de fosforilação de ADP a ATP por compostos com alto potencial de transferência do grupo fosforila: 1,3-bisfosfoglicerato e fosfoenolpiruvato. No primeiro, na reação catalisada pela *fosfoglicerato quinase*, o



grupo fosfato da ligação anidrido carboxílico-fosfórico do 1,3-bisfosfoglicerato, uma ligação rica em energia, é transferido ao ADP, produzindo ATP. O segundo evento de síntese de ATP depende da conversão de uma *ligação éster fosfato* em uma *ligação fosfoenol*, rica em energia. Esta conversão inicia-se com a transferência intramolecular do grupo éster fosfato do 3-fosfoglicerato, do carbono 3 para o carbono 2, catalisada pela *fosfoglicerato mutase*<sup>3</sup>. O processo envolve a formação intermediária de um composto bifosforilado, o 2,3-bisfosfoglicerato, originado por doação de um grupo fosfato da própria enzima ao substrato (Figura 9.7). Em seguida, a *enolase* promove a desidratação do 2-fosfoglicerato, originando o fosfoenolpiruvato. A formação deste composto rico em energia possibilita a síntese de ATP na reação subsequente, irreversível, catalisada pela *piruvato quinase*.



**Figura 9.7** Esquema da conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato, com a formação de um intermediário bifosforilado.

Em resumo, na Etapa I ocorrem duas fosforilações por ATP e, na Etapa III, duas por fosfato inorgânico; na Etapa IV, os quatro grupos fosfato são transferidos para ADP, formando quatro ATP – para cada molécula de glicose convertida a duas de piruvato pela glicólise, são produzidos 4 ATP (2 por triose). Para estabelecer o saldo final de produção de ATP devem ser descontados os 2 ATP consumidos inicialmente.

A equação geral da glicólise é:



Deve-se lembrar que uma equação geral *não* representa uma reação química; é apenas o somatório das reações que compõem a via metabólica, omitindo as reações intermediárias do processo. No caso em questão, se os compostos que aparecem no primeiro membro da equação forem adicionados a uma solução contendo todas as enzimas da glicólise, nenhuma reação ocorrerá, já que, para a primeira reação da glicólise, há necessidade de ATP.

A equação geral da glicólise evidencia que a oxidação da glicose a piruvato e a produção de ATP estão associadas à redução de  $\text{NAD}^+$ . Como o  $\text{NAD}^+$  existe nas células em concentrações limitantes, muito inferiores às dos substratos, o funcionamento contínuo da glicólise depende da reoxidação do NADH. Os seres vivos regeneram o  $\text{NAD}^+$  por dois mecanismos diferentes, segundo a disponibilidade de oxigênio. Em *aerobiose*, utilizam o oxigênio para oxidar o NADH (Capítulo 11); em *anaerobiose*, lançam mão, para o mesmo fim, do processo analisado a seguir.

### 9.2.1 Glicólise anaeróbia: fermentações

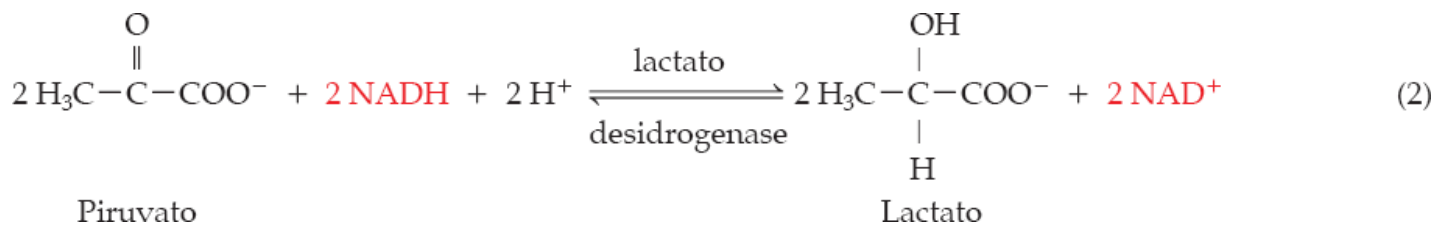
Em anaerobiose, o próprio piruvato produzido pela glicólise (ou um composto dele derivado) serve como receptor dos elétrons do NADH, assegurando o provimento de  $\text{NAD}^+$  para a continuidade da via glicolítica. O piruvato é, portanto, o composto a partir do qual a oxidação aeróbia e a anaeróbia da glicose divergem.

A glicólise anaeróbia é chamada *fermentação*. Existem muitos tipos de fermentações que obedecem, entretanto, a um padrão comum: as reações da glicólise, que convertem glicose a piruvato, com produção de NADH, são seguidas por uma segunda etapa, que oxida NADH a  $\text{NAD}^+$ . As fermentações diferem pelas reações que efetuam a regeneração do  $\text{NAD}^+$ . Segundo as enzimas de que a célula dispõe, o piruvato pode ser convertido a compostos diferentes, como lactato, etanol, propionato, butirato etc., que são sempre excretados da célula. As fermentações são designadas segundo o produto final: *fermentação láctica*, *alcoólica*, *propiónica* etc. As fermentações são processos autossuficientes, porque independem de outras vias para regenerar a coenzima  $\text{NAD}^+$  que utilizam.

Na *fermentação láctica*, como acontece nas reações com participação de  $\text{NAD}^+$ , o piruvato recebe dois elétrons e um



próton do NADH e um próton do meio, reduzindo-se a lactato:



Este é o processo utilizado por diversos microrganismos e por determinadas células e tecidos de mamíferos: hemácias, espermatozoides, medula renal, músculos esqueléticos etc. Quando os músculos esqueléticos realizam contração vigorosa (Seção 22.5), o oxigênio trazido pela circulação torna-se insuficiente para promover a oxidação da grande quantidade de NADH resultante do trabalho muscular e as fibras musculares ficam submetidas a uma anaerobiose relativa. A oxidação do NADH pelo piruvato gera o lactato caracteristicamente produzido por músculos em esforço intenso, permitindo que, pela regeneração do NAD<sup>+</sup>, a glicólise possa prosseguir, formando ATP.

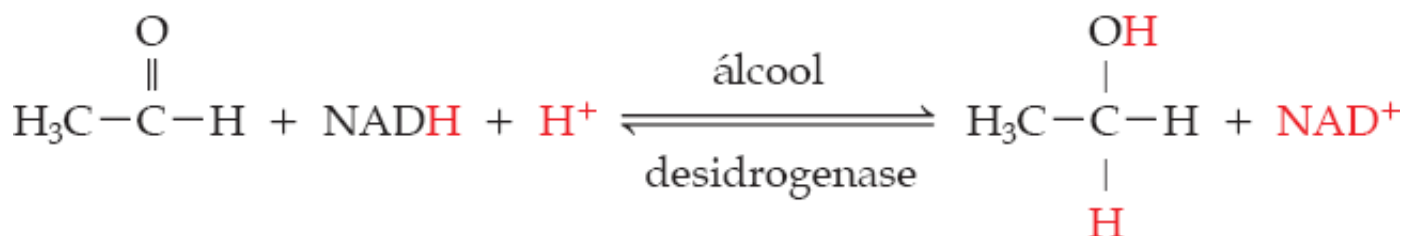
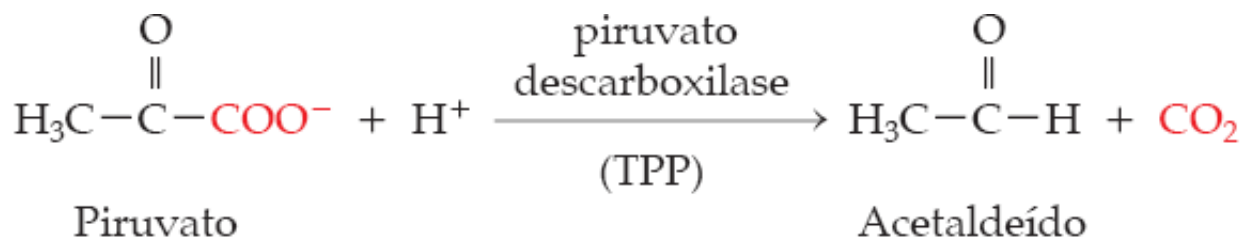
Nas situações de atividade muscular extenuante, costuma-se afirmar, *erroneamente*, que é produzido **ácido láctico**, que ao dissociar-se, causaria *acidose* (aumento da quantidade plasmática de prótons) — a reação da lactato desidrogenase forma lactato e **não** ácido láctico e a formação de lactato consome prótons e **não** os produz. A acidose decorre do transporte conjunto (simporte) de lactato e prótons para o plasma; os prótons originam-se da intensa hidrólise de ATP, vigente nessa situação (Seção 22.4).

Somando a equação de conversão de glicose a piruvato (equação 1) à de conversão de piruvato a lactato (equação 2), obtém-se a equação geral da fermentação láctica:



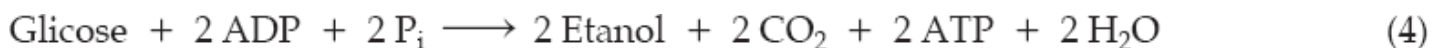
Esta equação geral, como todas, esconde etapas importantes da transformação: além da necessidade de ATP para iniciar a via, fica omitida a participação imprescindível do NAD<sup>+</sup>, sem a qual a via não pode ser levada a cabo.

Em certos organismos, como as leveduras e alguns tipos de bactérias, a regeneração do NAD<sup>+</sup> é feita pela *fermentação alcoólica*. Nesta via, o piruvato é descarboxilado, originando acetaldeído, que, servindo como acceptor dos elétrons do NADH, reduz-se a etanol:



A coenzima da piruvato descarboxilase é a *tiamina pirofosfato (TPP)*, que participa também da descarboxilação oxidativa do piruvato (Seção 9.2).

A equação geral da fermentação alcoólica é:



### **O rendimento da glicólise anaeróbia é de 2 mols de ATP por mol de glicose**

As fermentações láctica e alcoólica resultam na produção líquida de 2 ATP, como mostram as equações 3 e 4. O rendimento da oxidação anaeróbia da glicose é muito menor do que aquele da sua oxidação aeróbia: 2 mols *versus* 38 mols de ATP por mol de glicose. A despeito disto, grande número de microrganismos e também células de eucariotos são

capazes de sobreviver à custa da glicólise anaeróbia.

O requerimento de ADP e  $P_i$  para a síntese de ATP faz antecipar um aspecto da regulação da glicólise em células de mamíferos. Tendo em vista que as quantidades celulares de ADP são restritas, a continuidade da via fica atrelada à utilização de ATP por processos que requerem energia e originam ADP e  $P_i$ .

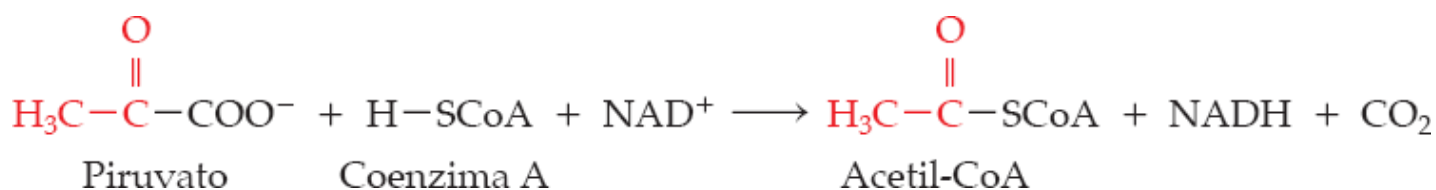
A glicólise, como praticamente todas as vias metabólicas, é estritamente regulada, por intermédio do controle da atividade e da síntese de algumas de suas enzimas.

 *A descrição completa da regulação da glicólise encontra-se na Seção 20.2.*

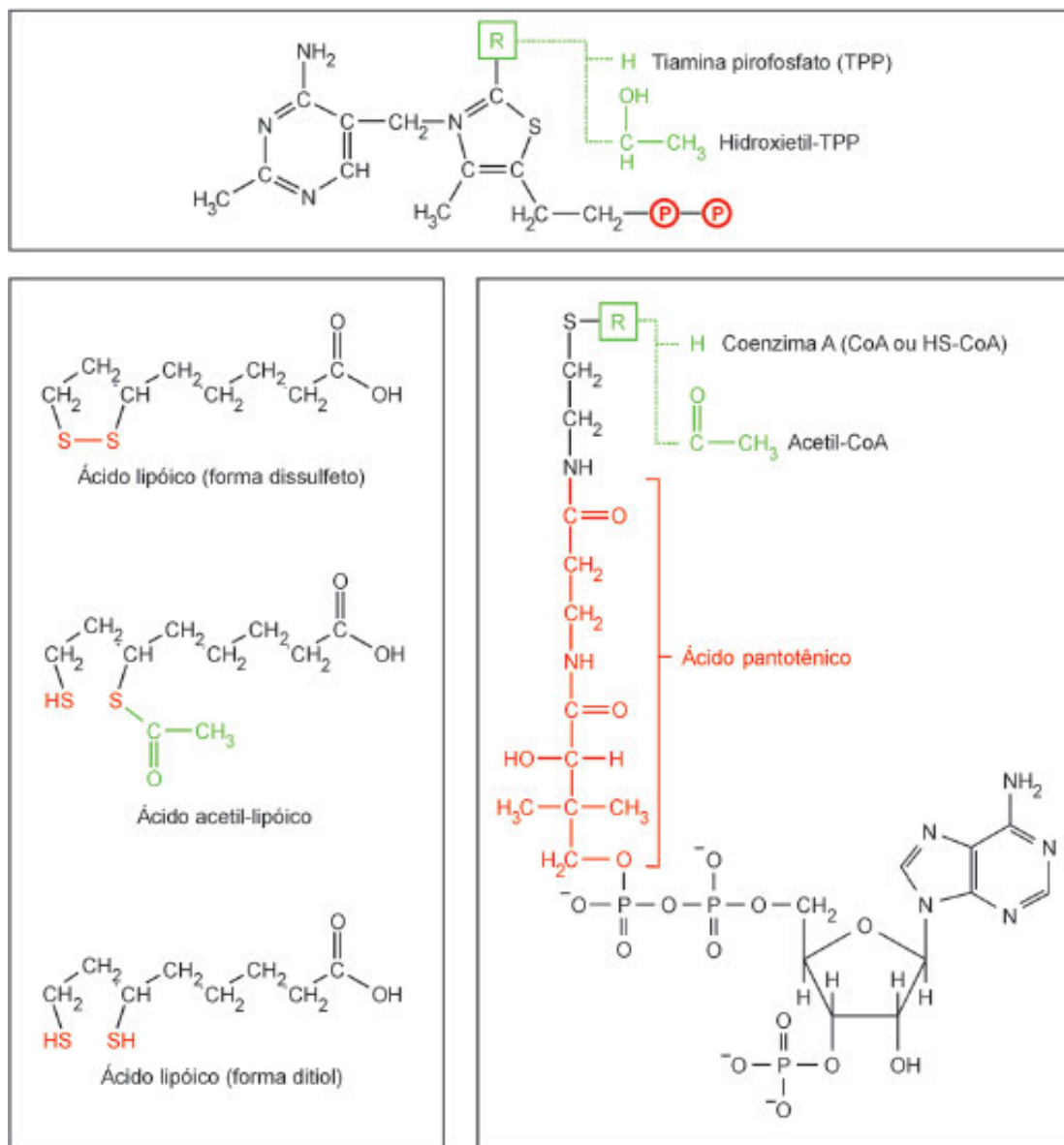
### 9.3 Conversão de piruvato a acetil-CoA

Em condições aeróbias, o primeiro passo para a oxidação total do piruvato é a sua conversão a acetil-CoA. Nas células eucarióticas, o piruvato é transportado do citosol para a mitocôndria (Seção 11.10), onde é transformado em acetil-CoA, conectando a glicólise e o ciclo de Krebs (Figura 9.1). O piruvato deixa de ser o aceptor dos elétrons do NADH produzido pela glicólise e esta coenzima é oxidada pelo oxigênio, o aceptor final de elétrons no metabolismo aeróbio, por um processo indireto (Seção 11.9).

O piruvato origina acetil-CoA, por descarboxilação oxidativa, de acordo com a equação geral:



O processo é irreversível e consiste na transferência do grupo acetila, proveniente da descarboxilação do piruvato, para a *coenzima A* (Figura 9.8). Esta coenzima tem justamente a função de carregadora de grupos acila, aos quais se liga por seu grupo sulfidríla terminal, estabelecendo uma ligação tioéster rica em energia (Tabela 4.3, Seção 4.1). A oxidação de piruvato a acetil-CoA é um exemplo notável da utilização de vitaminas no metabolismo. Esta única transformação não pode ser realizada sem o concurso de *quatro* vitaminas.



**Figura 9.8** Estrutura das coenzimas (exceto  $\text{NAD}^+$  e  $\text{FAD}$ ) que participam da oxidação de piruvato a acetil-CoA e dos seus derivados formados nesta reação.

A reação de formação de acetil-CoA a partir de piruvato ocorre em etapas sequenciais, catalisadas por um sistema multienzimático, chamado *complexo piruvato desidrogenase*. O complexo contém três enzimas diferentes — *piruvato desidrogenase*, *di-hidrolipoil transacetilase* e *di-hidrolipoil desidrogenase* — e cinco cofatores — *tiamina pirofosfato (TPP)*, *ácido lipoico*, *coenzima A (CoA)*, *flavina adenina dinucleotídeo (FAD)* e *nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ )* (Figura 9.8). Dos cinco cofatores, quatro — TPP, CoA, FAD e  $\text{NAD}^+$  — são derivados de vitaminas: tiamina ( $\text{B}_1$ ), ácido pantotênico ( $\text{B}_5$ ), riboflavina ( $\text{B}_2$ ) e nicotinamida ( $\text{B}_3$ ), respectivamente. O ácido lipoico é um ácido graxo saturado de oito carbonos, com dois grupos sulfidríla ( $-\text{SH}$ ) que se oxidam reversivelmente, formando uma ligação dissulfeto ( $-\text{S}-\text{S}-$ ); o ácido lipoico está covalentemente ligado à extensa cadeia lateral de um resíduo de lisina da di-hidrolipoil transacetilase, o que resulta em um braço longo e flexível, graças ao qual é capaz de interagir com os locais ativos das duas outras enzimas do complexo, funcionando como um transferidor do grupo acetila.

A primeira etapa (Figura 9.9) é a descarboxilação do piruvato e a ligação do grupo hidroxietila ao TPP, catalisada pela piruvato desidrogenase. Esta mesma enzima é responsável pela oxidação do grupo hidroxietila a acetila e sua transferência à forma oxidada (forma dissulfeto) do ácido lipoico, que se reduz a ácido acetil-lipoico. A próxima enzima do complexo, a di-hidrolipoil transacetilase, transfere o grupo acetila para a coenzima A, formando acetil-CoA e a forma dissulfidríla do ácido lipoico. Esta forma reduzida do ácido lipoico é oxidada pela terceira enzima, a di-hidrolipoil desidrogenase, uma flavoproteína contendo FAD, que recebe os prótons e elétrons e os transfere finalmente para o  $\text{NAD}^+$ , que incorpora um próton e dois elétrons. O NADH formado é oxidado na cadeia de transporte de elétrons (Seção 11.2).

Uma só partícula do complexo piruvato desidrogenase é maior do que um ribossomo e consiste na união, por ligações não covalentes, de dezenas de moléculas de cada uma das três enzimas componentes do complexo. A associação das enzimas permite que essa reação complexa ocorra rápida e coordenadamente. Fazem parte ainda da partícula várias moléculas de enzimas reguladoras.



---

<sup>1</sup>A denominação *bisfosfato* é empregada quando dois fosfatos estão ligados a locais diferentes de uma molécula, como na frutose 1,6-bisfosfato. Se os dois fosfatos estão unidos por ligação anidrido fosfórico, trata-se de um *difosfato*, como no ADP (adenosina difosfato).

<sup>2</sup>Álcoois podem reagir com o grupo carbonila de aldeídos formando hemiacetais; no caso de um *tioálcool* (grupo SH da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), origina-se um tio-hemiacetal.

<sup>3</sup>Mutases são um tipo particular de isomerases, que catalisam a transferência de um grupo fosfato de uma posição para outra, na mesma molécula.

# 10 Ciclo de Krebs

O piruvato formado a partir de glicose no citosol origina o grupo acetila presente na acetil-CoA mitocondrial (Seção 9.2). Além da glicose, vários aminoácidos, ao serem degradados, produzem piruvato e, portanto, acetil-CoA. Outros aminoácidos e os ácidos graxos produzem acetil-CoA sem a formação intermediária de piruvato (Figura 8.3). A acetil-CoA constitui, portanto, o ponto de convergência do metabolismo degradativo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos e também de etanol. Completando o catabolismo destes compostos, a acetil-CoA, na mitocôndria, é totalmente oxidada a CO<sub>2</sub> pelo ciclo de Krebs, com a concomitante produção de coenzimas reduzidas. Paralelamente a esta oxidação, o ciclo de Krebs produz compostos utilizados como precursores para biossínteses.

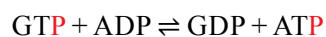
## 10.1 Reações do ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Figura 10.1) inicia-se com a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato, formando citrato, uma reação catalisada pela *citrato sintase*<sup>1</sup>. O citrato é isomerizado a isocitrato, com a formação de um intermediário, o *cis*-aconitato, por ação da *aconitase*. A aconitase, nos mamíferos, ocorre como duas isoenzimas, uma mitocondrial, que participa do ciclo de Krebs, e outra citoplasmática. O centro ativo das aconitases inclui um centro ferro-enxofre (Seção 11.2), essencial para a catálise. Quando há baixa disponibilidade de ferro, a isoenzima citoplasmática perde o centro ferro-enxofre e a atividade de aconitase: a apoproteína resultante exibe uma função diferente, a capacidade de ligar-se a RNA, regulando a síntese de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro. A aconitase é um exemplo clássico de contradição do dogma: um gene → uma proteína → uma função.

A *isocitrato desidrogenase* promove a oxidação de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato, com redução de NAD<sup>+</sup> e liberação de CO<sub>2</sub>. No citosol e nas mitocôndrias das células de eucariotos, existem isoenzimas da isocitrato desidrogenase que utilizam NADP<sup>+</sup> como coenzima e cuja função seria realmente produzir NADPH, um importante agente redutor utilizado em processos celulares antioxidantes (Seção 12.3) e em sínteses redutoras (Seção 16.5).

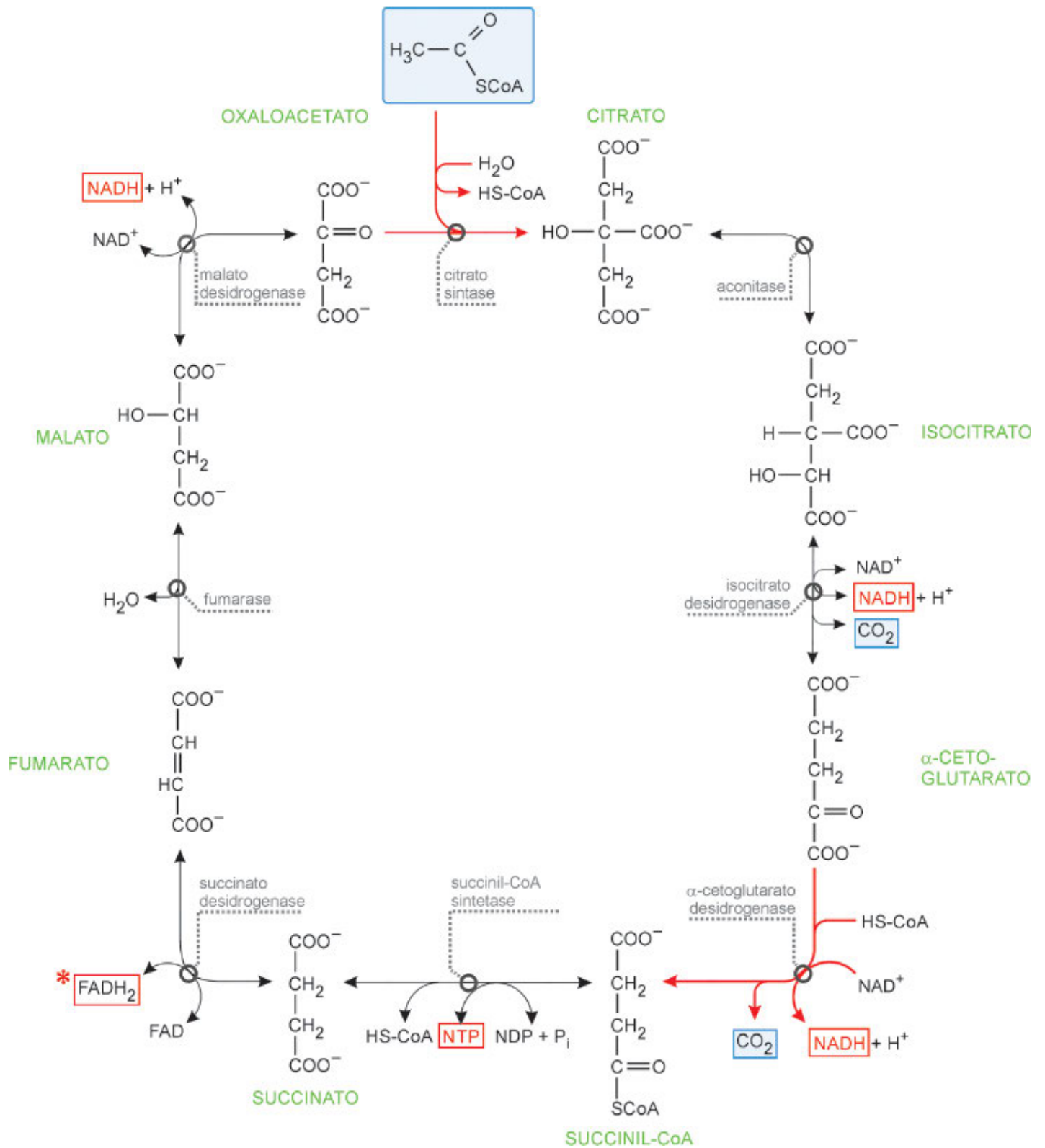
O  $\alpha$ -cetoglutarato é transformado em succinil-CoA, graças à atuação do complexo  *$\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase*, semelhante ao complexo piruvato desidrogenase quanto à estrutura e ao mecanismo de reação. Trata-se, em ambos os casos, da descarboxilação oxidativa de um  $\alpha$ -cetoácido (piruvato ou  $\alpha$ -cetoglutarato) e ligação do grupo remanescente (acetila ou succinila) à coenzima A, formando um tioéster (rico em energia), com participação de TPP, ácido lipoico, FAD e NAD<sup>+</sup>, que é reduzido a NADH.

A seguir, succinil-CoA é convertida a succinato, acoplada à síntese de outro composto rico em energia, um nucleosídeo trifosfato (NTP) a partir de um nucleosídeo difosfato (NDP) e P<sub>i</sub>; a reação é catalisada pela *succinil-CoA sintetase* (ou *succinato-CoA ligase*). Existem várias isoenzimas da succinil-CoA sintetase que diferem quanto aos organismos onde são expressas e quanto à especificidade para os nucleotídeos sobre os quais atuam: permitem a formação de ATP a partir de ADP e P<sub>i</sub> ou de GTP (guanosina trifosfato — Figura 10.2) a partir de GDP (guanosina difosfato) e P<sub>i</sub>. A succinil-CoA sintetase encontrada em plantas origina ATP; nas bactérias, dependendo da espécie considerada, pode-se formar ATP ou GTP, ou ambos; em mamíferos, incluindo os seres humanos, as duas isoenzimas são expressas e as suas quantidades relativas variam segundo o tecido. O GTP pode ser utilizado em reações dele dependentes (Seção 14.2), ou pode transferir um grupo fosfato ao ADP, produzindo ATP, por ação da *nucleosídeo difosfato quinase*:

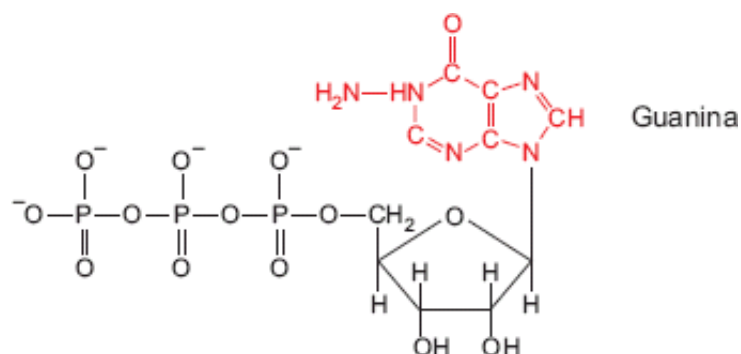


A próxima reação é catalisada pela única enzima do ciclo de Krebs que é parte integrante da membrana interna da mitocôndria; as demais estão em forma solúvel na matriz mitocondrial. Trata-se de uma flavoproteína, a *succinato desidrogenase*, também denominada *succinato-ubiquinona oxidação-redução* ou *Complexo II* da cadeia respiratória (Seção 11.2).



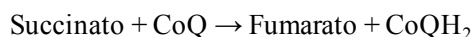


**Figura 10.1** Ciclo de Krebs. Na reação da succinil-CoA sintetase, o nucleosídeo trifosfato (NTP) pode ser ATP ou GTP e o nucleosídeo difosfato (NDP), ADP ou GDP. \* $FADH_2$  não é liberado na reação, porque está ligado à succinato desidrogenase; seus elétrons e prótons reduzem a coenzima Q (CoQ) a  $CoQH_2$ :  $FADH_2 + CoQ \rightarrow FAD + CoQH_2$ .



**Figura 10.2** O GTP difere do ATP por conter guanina como base nitrogenada.

Na primeira etapa da reação, o succinato é oxidado a fumarato e o FAD é reduzido a FADH<sub>2</sub>. FAD, diferentemente de NAD<sup>+</sup>, liga-se covalentemente à enzima, consistindo em um grupo prostético. A Figura 10.1 mostra, como recurso didático, o FADH<sub>2</sub> liberado na reação, sendo que ele não se dissocia da succinato desidrogenase. Os elétrons e prótons do FADH<sub>2</sub> são transferidos para a ubiquinona ou coenzima Q (CoQ), este sim, um composto que se difunde livremente na bicamada lipídica da membrana interna da mitocôndria. A representação exata da reação da succinato desidrogenase é:



Ainda assim, considera-se FADH<sub>2</sub> como um produto do ciclo de Krebs, e de outras vias metabólicas que incluem flavoproteínas, para viabilizar o cômputo da quantidade de ATP sintetizado a partir de coenzimas reduzidas (Seções 11.8 e 16.2.1).

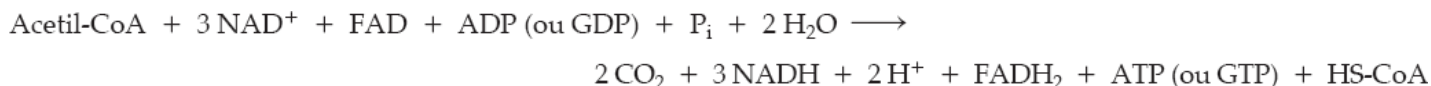
O fumarato é hidratado a malato pela *fumarase*. A *malato desidrogenase* oxida o malato a oxaloacetato, reduzindo NAD<sup>+</sup> e fechando o ciclo. Como o oxaloacetato é sempre regenerado ao final de cada volta, o ciclo de Krebs pode oxidar acetil-CoA continuamente, sem gasto efetivo de oxaloacetato. Em paralelo a esta oxidação são reduzidos 3 NAD<sup>+</sup> e 1 FAD.

Observa-se, pela descrição das reações que o compõem, que o ciclo de Krebs é uma via eminentemente oxidativa para a acetil-CoA: os átomos de carbono do seu grupo acetila são estequiometricamente convertidos a CO<sub>2</sub>. Esta oxidação tem consequências fundamentais para o metabolismo de mamíferos. Como a degradação de ácidos graxos gera unicamente acetil-CoA, que é completamente oxidada no ciclo de Krebs, os ácidos graxos são convertidos totalmente a CO<sub>2</sub>. Em razão desta conversão, os ácidos graxos não podem gerar glicose (Seção 10.3).

A maioria das reações do ciclo de Krebs é reversível, mas o sentido do ciclo é determinado pela irreversibilidade das reações catalisadas pela citrato sintase e pela  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (setas coloridas na Figura 10.1). Esta última reação mantém baixas as concentrações de  $\alpha$ -cetoglutarato e, indiretamente, de isocitrato. Assim, apesar de o equilíbrio da reação catalisada pela aconitase favorecer acentuadamente a formação de citrato, este composto não se acumula na mitocôndria enquanto se processar a oxidação de isocitrato.

### O ciclo de Krebs depende da cadeia de transporte de elétrons para a reoxidação de coenzimas

A equação geral do ciclo de Krebs é:

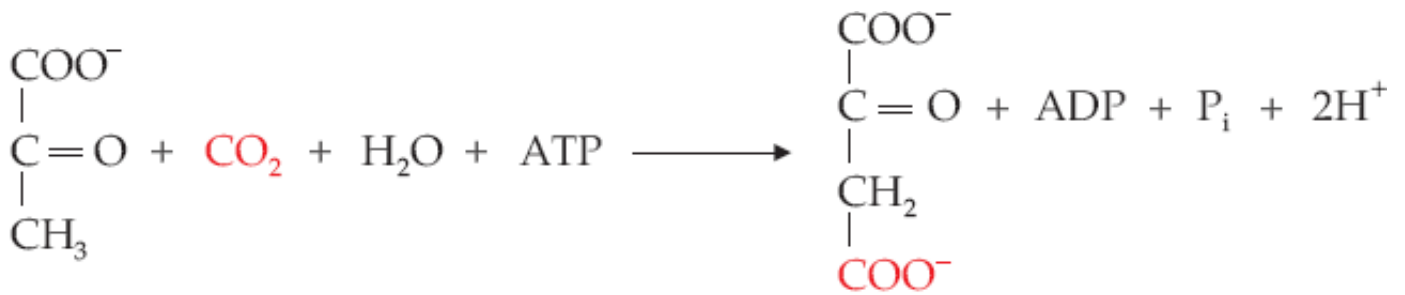


Embora produza apenas 1 ATP (ou 1 GTP) por acetil-CoA oxidada, o ciclo de Krebs contribui para a formação de grande parte do ATP produzido pela célula, pois a energia da oxidação da acetil-CoA é conservada sob a forma de coenzimas reduzidas e, posteriormente, usada para síntese de ATP. A oxidação das coenzimas é obrigatoriamente feita pela cadeia de transporte de elétrons (Capítulo 11) e, portanto, o ciclo de Krebs, assim como a conversão de piruvato a acetil-CoA, só pode funcionar em condições aeróbias, ao contrário da glicólise.

## 10.2 Função anabólica do ciclo de Krebs

### A redução de coenzimas não é a única função do ciclo de Krebs

Os compostos intermediários do ciclo de Krebs podem ser utilizados como precursores em vias biossintéticas: oxaloacetato e  $\alpha$ -cetoglutarato formam aspartato e glutamato, respectivamente; succinil-CoA é precursora do grupo heme etc. A eventual retirada desses intermediários pode ser compensada por reações que permitem restabelecer o seu nível. Entre essas reações, chamadas *reações anapleróticas* (reações de preenchimento), a mais importante é a que leva à formação de oxaloacetato a partir do piruvato, catalisada pela *piruvato carboxilase*:



Piruvato

Oxaloacetato

O oxaloacetato, além de ser um intermediário do ciclo de Krebs, participa da gliconeogênese. No capítulo referente a esta via metabólica (Capítulo 14), a reação catalisada pela piruvato carboxilase será analisada com maiores detalhes.

A degradação de vários aminoácidos também produz intermediários do ciclo de Krebs, constituindo reações anapleróticas adicionais.

### A ativação da piruvato carboxilase aumenta a velocidade do ciclo de Krebs

No ciclo de Krebs, o oxaloacetato tem um papel até certo ponto catalítico: como não é efetivamente consumido pelas reações do ciclo, já que é repostado pela última reação, teoricamente com apenas uma molécula de oxaloacetato poder-se-ia oxidar uma quantidade qualquer de acetil-CoA. Entretanto, a velocidade com que esta oxidação ocorreria seria muito baixa, uma vez que, após a condensação de acetil-CoA com oxaloacetato, iniciando o ciclo, novas moléculas de acetil-CoA só poderiam ser introduzidas no ciclo quando, após a última reação, o oxaloacetato fosse regenerado. Com quantidades maiores de oxaloacetato disponíveis, a eficiência da utilização de acetil-CoA pelo ciclo aumentaria. O ajuste da velocidade de consumo de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs à sua concentração é feito por intervenção na reação catalisada pela piruvato carboxilase. *Esta enzima é fortemente ativada pela própria acetil-CoA.* Desta forma, quando, por exemplo, a glicólise é intensa e grande quantidade de piruvato é transformada em acetil-CoA, o acúmulo deste composto ativa a piruvato carboxilase e a conversão de piruvato em oxaloacetato é favorecida. Com concentrações concomitantemente altas de oxaloacetato e acetil-CoA, a reação catalisada pela citrato sintase, que dá início ao ciclo, pode funcionar a velocidades altas.



A regulação completa do ciclo de Krebs está descrita na Seção 20.5.

## 10.3 Ciclo do glioxilato

### O ciclo do glioxilato permite a síntese de glicose a partir de acetil-CoA

Nos vegetais, em leveduras e algumas bactérias, encontra-se uma via alternativa de metabolismo de acetil-CoA, chamada *ciclo do glioxilato* (Figura 10.3), que permite a produção líquida de intermediários do ciclo a partir de acetil-CoA. Esta via conta com a participação de enzimas do ciclo de Krebs, além de duas enzimas **ausentes de tecidos animais**: a *isocitrato liase* e a *malato sintase*. Por ação da isocitrato liase, o isocitrato é cindido em succinato e glioxilato; o glioxilato condensa-se com acetil-CoA, produzindo malato, na reação catalisada pela malato sintase. Estas duas enzimas localizam-se, nos vegetais, em organelas chamadas *glioxissomos*, um tipo especial de peroxissomos (Seção 16.2) que, por efetuarem também a oxidação de ácidos graxos, dispõem de uma fonte de acetil-CoA.

No ciclo de Krebs, isocitrato converte-se em succinato por reações que envolvem a perda de dois carbonos, sob a forma de  $\text{CO}_2$ . No ciclo do glioxilato, os seis carbonos do isocitrato originam succinato ( $\text{C}_4$ ) e glioxilato ( $\text{C}_2$ ). O glioxilato reage com outra molécula de acetil-CoA formando malato, que regenera oxaloacetato. O ciclo do glioxilato consome, portanto, duas moléculas de acetil-CoA ( $\text{C}_2 + \text{C}_2$ ) e produz uma molécula de succinato ( $\text{C}_4$ ). A equação geral do ciclo do glioxilato é:

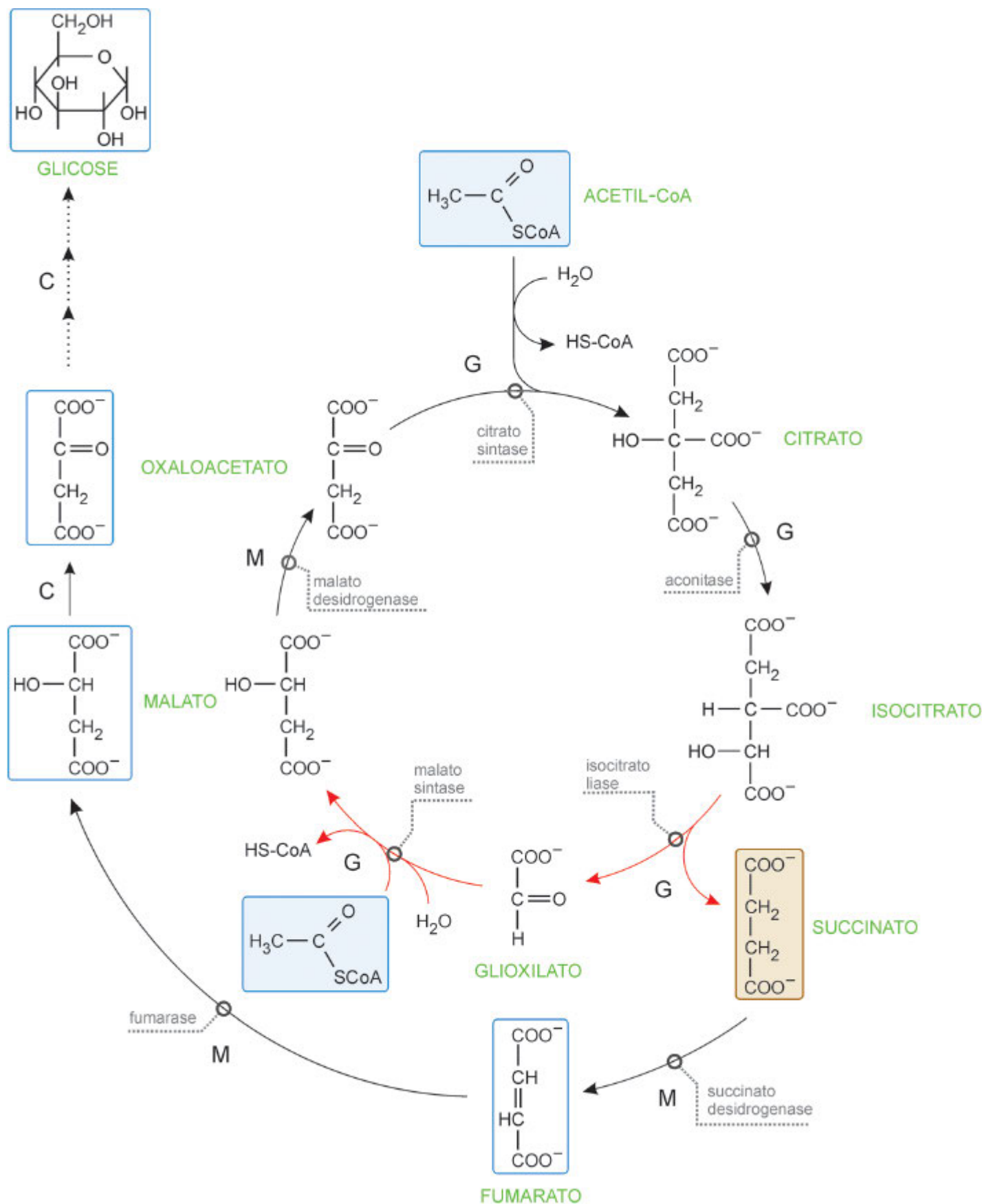


A síntese líquida de succinato viabiliza a conversão dos carbonos da acetil-CoA a glicose: o succinato, por ação de enzimas do ciclo de Krebs e da gliconeogênese, produz glicose. Nos vegetais, esta síntese envolve a participação de diferentes compartimentos celulares e, conseqüentemente, o transporte de compostos através de membranas, mediado por permeases. No glioxissomo, acetil-CoA condensa-se com oxaloacetato formando citrato, que é isomerizado a isocitrato, por reações idênticas às do ciclo de Krebs; isocitrato é cindido em glioxilato e succinato. O glioxilato reage com acetil-CoA, originando malato, que regenera oxaloacetato por ação da malato desidrogenase mitocondrial. O succinato não pode ser utilizado pelo glioxissomo e, na mitocôndria, transforma-se em malato, graças às atuações da succinato desidrogenase e

da fumarase do ciclo de Krebs. O malato, por ação da malato desidrogenase citosólica, origina oxaloacetato, que é convertido em glicose pelas reações da gliconeogênese.

O ciclo do glioxilato, dessa forma, permite obter glicose a partir de acetil-CoA, ou seja, de ácidos graxos. **Esta é uma impossibilidade metabólica dos animais**, pois não sintetizam as enzimas do ciclo do glioxilato e, no ciclo de Krebs, para cada molécula de acetil-CoA introduzida, são liberadas duas moléculas de CO<sub>2</sub>, não havendo, assim, ganho líquido de carbonos para a formação de oxaloacetato.

O ciclo do glioxilato é particularmente ativo em sementes oleaginosas em germinação, promovendo a transformação dos ácidos graxos de suas reservas lipídicas em glicose, precursora da celulose. Este ciclo possibilita, ainda, a certas bactérias, crescerem em meios contendo apenas ácidos graxos como fonte de carbonos.



**Figura 10.3** Ciclo do glioxilato. As enzimas isocitrato liase e malato sintase (em vermelho), presentes em plantas e bactérias, permitem a síntese líquida de succinato a partir de acetil-CoA. O succinato é transportado para a mitocôndria, onde origina malato; no citosol, o malato é convertido a oxaloacetato, que pode originar glicose pela gliconeogênese (setas pontilhadas). Estão omitidas, das reações comuns ao ciclo de Krebs, as coenzimas participantes. G = Glioxissomo; M = Mitocôndria; C = Citosol.

## Bibliografia

- Anderson CP *et al.*: Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1823** (9): 1468-1483, 2012.
- Bubber P *et al.*: Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int* **45** (7):1021-8, 2004.
- Huberts DH, van der Klei IJ: Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* **1803** (4): 520-525, 2010.
- Kornberg H: Krebs and his trinity of cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1** (3):225-8, 2000.
- Krebs HA, Johnson WA: The role of citric acid in the intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**: 148-156, 1937.
- Lambeth DO: Reconsideration of the significance of substrate-level phosphorylation in the citric acid cycle. *Biochem Mol Biol Edu* **34** (1): 21-29, 2006.
- Lambeth DO *et al.*: Expression of two succinyl-CoA synthetases with different nucleotide specificities in mammalian tissues. *J Biol Chem* **279** (35): 36621-36624, 2004.
- Penfield S *et al.*: Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: Arabidopsis as a model system. *Biochem Soc Trans* **33**:380-383, 2005
- Raimundo N *et al.*: Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol Med* **17** (11): 641-649, 2011.
- Stobbe MD *et al.*: Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *FASEB J* **26** (9): 3625-3636, 2012.

---

<sup>1</sup>*Sintasas* são enzimas que catalisam reações de condensação sem a participação de nucleosídeos trifosfato (ATP, GTP etc.). Nas reações catalisadas por *sintetases*, ao contrário, há participação de nucleosídeos trifosfato.



# 13 Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose

## 13.1 Metabolismo do glicogênio

O glicogênio é um polímero de glicose e constitui uma reserva do açúcar em bactérias, fungos e animais. A vantagem biológica de armazenar glicose na forma polimerizada é a redução da osmolaridade, resultante do menor número de partículas em solução. No ser humano, as principais reservas de glicogênio ocorrem no fígado e em músculos esqueléticos e correspondem, em média, a 100 e 300 g, respectivamente. O glicogênio é sintetizado nesses órgãos quando a oferta de glicose supera a sua utilização, como acontece após as refeições.

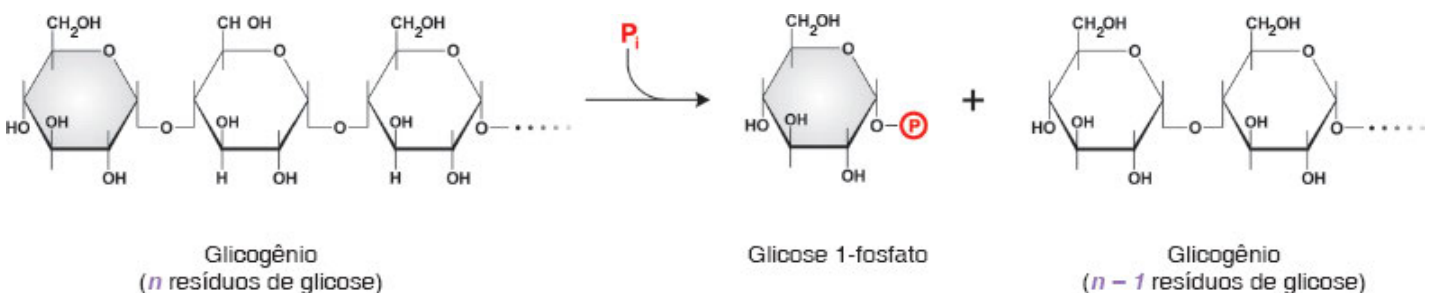
Ao serem degradadas, as duas reservas de glicogênio atendem necessidades diferentes. A degradação do glicogênio hepático é responsável pela manutenção da glicemia nos períodos entre as refeições, sobretudo durante o jejum noturno. O fígado não aproveita o glicogênio que armazena; sempre que a hipoglicemia induz a degradação do polímero, a glicose resultante é exportada e consumida por outros órgãos ou tecidos. Nos tecidos aeróbios, a glicose é totalmente oxidada a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ; em células anaeróbias como as hemácias, a glicose é degradada a lactato.

Em contraposição, o glicogênio dos músculos esqueléticos provê energia para as próprias fibras musculares e a glicose resultante de sua degradação não é exportada. As fibras musculares de contração rápida (Seção 22.5) têm um conteúdo de glicogênio maior do que as fibras lentas. Em contração intensa, quando a demanda energética ultrapassa o aporte de oxigênio, o glicogênio das fibras rápidas é convertido a lactato (Seção 9.1.1), daí serem também chamadas de fibras glicogenolíticas.

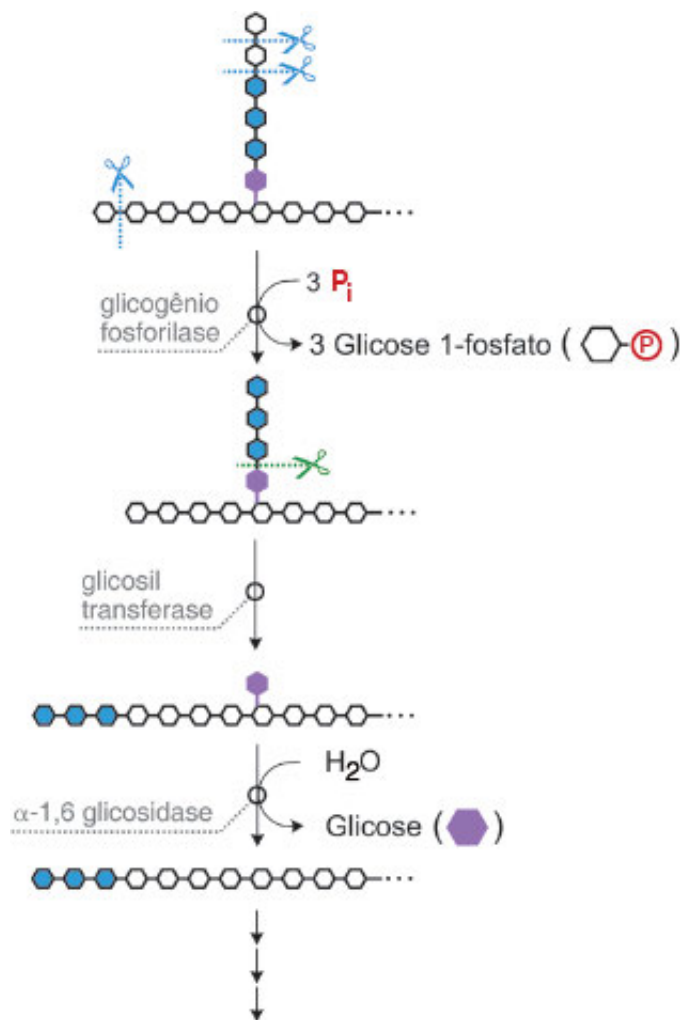
As enzimas que catalisam a síntese e a degradação do glicogênio, além de proteínas reguladoras destes processos, estão intimamente associadas ao polímero, encontrado no citosol na forma de grânulos.

### A degradação do glicogênio produz glicose 1-fosfato

A degradação do glicogênio, a *glicogenólise*, consiste na remoção sucessiva de resíduos de glicose, a partir das suas extremidades não redutoras (Seção 6.1), por ação da *glicogênio fosforilase*, uma enzima que tem piridoxal fosfato, um derivado da vitamina  $\text{B}_6$ , como grupo prostético. Esta enzima catalisa a fosforólise da ligação  $\alpha$ -1,4, liberando um resíduo de glicose como glicose 1-fosfato. A reação é semelhante à hidrólise, com a diferença de usar fosfato inorgânico ( $\text{HPO}_4^{2-}$  a pH 7,4, representado por  $\text{P}_i$ ) no lugar da água:



A ação da glicogênio fosforilase prossegue ao longo da cadeia, liberando um a um os resíduos de glicose, mas termina 4 resíduos antes de uma ramificação. A degradação pode continuar por ação de outra enzima, a *enzima desramificadora*, que atua como *glicosiltransferase*, transferindo 3 dos 4 resíduos de glicose remanescentes na ramificação para uma extremidade não redutora da cadeia de glicogênio, formando uma ligação  $\alpha$ -1,4 (Figura 13.1); na sua nova posição, estes resíduos podem ser liberados por ação da glicogênio fosforilase.



**Figura 13.1** Esquema da degradação do glicogênio.

O resíduo de glicose restante está ligado à cadeia principal por ligação  $\alpha$ -1,6; esta ligação é hidrolisada pela segunda atividade da enzima desramificadora, de  $\alpha$ -1,6 glicosidase. É interessante que, neste caso, ocorre uma hidrólise, em lugar da fosforólise produzida pela glicogênio fosforilase — cerca de 10% dos resíduos de glicose do glicogênio são liberados como *glicose* e o restante como *glicose 1-fosfato*.

A glicose 1-fosfato é convertida pela *fosfoglicomutase* a glicose 6-fosfato. No músculo, a glicose 6-fosfato pode ser degradada pela glicólise anaeróbia, formando lactato, o destino metabólico preponderante nas fibras rápidas, ou pelo metabolismo oxidativo aeróbio (glicólise aeróbia, ciclo de Krebs, cadeia respiratória), produzindo  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , típico das fibras lentas.

Como o glicogênio é degradado por fosforólise, o produto formado é a glicose fosforilada: para originar glicose livre, o fosfato tem de ser removido. No fígado, a glicose 6-fosfato é hidrolisada por ação da *glicose 6-fosfatase*, produzindo glicose (Figura 13.5). A glicose, ao contrário da glicose fosforilada, pode atravessar a membrana plasmática por meio de permeases específicas (Seção 19.6.3). A glicose 6-fosfatase fica inserida na membrana do retículo endoplasmático, com o sítio catalítico voltado para o lúmen da organela e requer transportadores para o substrato (glicose 6-fosfato) e os produtos da reação (glicose e fosfato inorgânico). A deficiência de glicose 6-fosfatase causa a doença hereditária do metabolismo de glicogênio tipo I (GSD I, de *Glycogen Storage Disease type I*) ou doença de von Gierke (Tabela 13.1), caracterizada principalmente por hipoglicemia grave no jejum, grande aumento do depósito de glicogênio hepático, hiperlipidemia etc. A falta do transportador de glicose 6-fosfato é a causa de uma variante de GSD I, denominada GSD Ib.

A glicose 6-fosfatase ocorre nos rins, além do fígado, onde participa também da gliconeogênese (Seção 14.2).

A degradação de glicogênio é um processo rápido e eficiente, graças à sua própria estrutura e à presença das enzimas de degradação intimamente associadas aos grânulos de glicogênio: o grande número de ramificações da cadeia possibilita a ação simultânea de muitas moléculas de fosforilase a partir de cada extremidade não redutora. Assim, cerca de 50% das ramificações da cadeia de glicogênio muscular são degradadas em poucos segundos. O processo atende à demanda energética muscular intensa indicada pela liberação de adrenalina; no caso da glicogenólise hepática, ativada por glucagon, a rapidez do processo corrige o nível glicêmico, evitando a hipoglicemia. A degradação do glicogênio geralmente não é completa, restando um núcleo não degradado que serve de ponto de partida para a ressíntese.

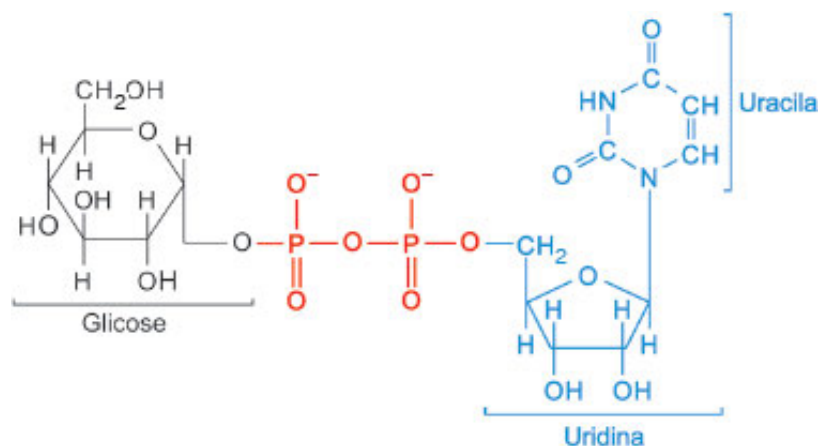
Tipo	Nome	Enzima deficiente	Conseqüências
I	von Gierke	Glicose 6-fosfatase	Acúmulo de glicogênio hepático e hepatomegalia; incapacidade de corrigir a glicemia no jejum
II	Pompe <sup>1</sup>	$\alpha$ -1,4 Glicosidase <sup>2</sup>	Acúmulo generalizado de glicogênio; insuficiência cardiorrespiratória e morte geralmente antes dos 2 anos de idade na forma infantil
III	Cori	Enzima desramificadora	Glicogênio com ramificações curtas, resultantes da ação da glicogênio fosforilase; hipoglicemia e hepatomegalia menos severas que no tipo I
IV	Andersen	Enzima ramificadora	Glicogênio com cadeias muito longas não ramificadas; geralmente fatal
V	McArdle	Glicogênio fosforilase muscular	Acúmulo de glicogênio muscular; incapacidade de realizar exercícios intensos
VI	Hers	Glicogênio fosforilase hepática	Semelhantes às do tipo I, mas menos intensas
VII	Tarui	Fosfofrutoquinase 1 muscular e de hemácias	Semelhantes à do tipo V, além de anemia hemolítica

<sup>1</sup> Existem três formas da doença: infantil (a mais grave), juvenil e adulta.

<sup>2</sup> Enzima lisossômica que hidrolisa os segmentos lineares do glicogênio; em indivíduos normais, constitui uma via secundária do metabolismo do glicogênio.

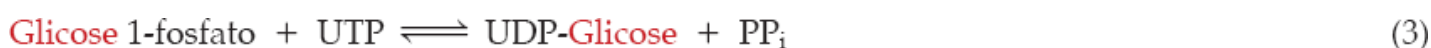
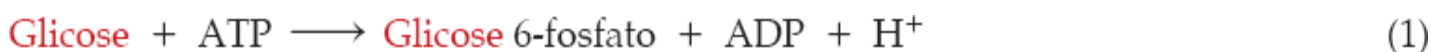
### Para cada unidade de glicose incorporada ao glicogênio há consumo de 2 ATP

O glicogênio é sintetizado pela *glicogenogênese*, uma via diferente da via de degradação. A síntese consiste na repetida adição de unidades de glicose às extremidades não redutoras de um fragmento de glicogênio. A glicose a ser incorporada deve estar sob uma forma ativada, ligada a um nucleotídeo de uracila, constituindo *uridina difosfato glicose (UDP-Glicose)* (Figura 13.2).



**Figura 13.2** Estrutura da uridina difosfato glicose (UDP-G).

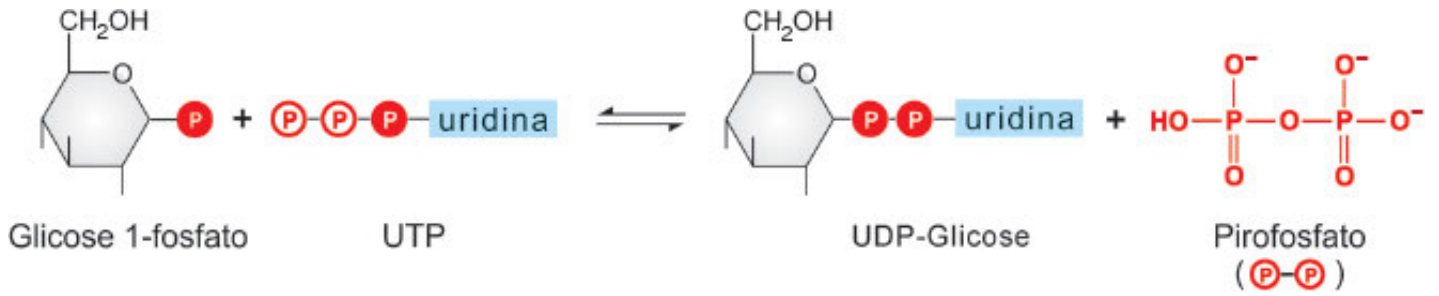
UDP-Glicose é produzido a partir de glicose por uma série de reações: (1) fosforilação de glicose, com consumo de ATP, catalisada pela glicoquinase no fígado e hexoquinase no músculo; (2) isomerização da glicose 6-fosfato a glicose 1-fosfato, pela fosfoglicomutase e (3) reação deste açúcar com UTP formando UDP-Glicose e pirofosfato ( $\text{HP}_2\text{O}_7^{3-}$  ou  $\text{PP}_i$ ), promovida pela *UDP-glicose pirofosforilase*:



O pirofosfato é hidrolisado por ação da *pirofosfatase*, produzindo fosfato inorgânico ( $\text{HPO}_4^{2-}$  ou  $\text{P}_i$ ):

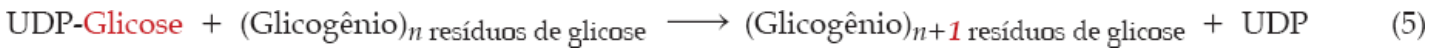


A formação de UDP-Glicose está detalhada na Figura 13.3:



**Figura 13.3** Reação catalisada pela UDP-glicose pirofosforilase.

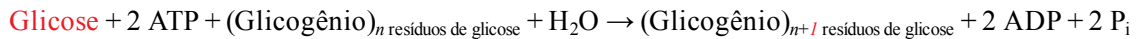
UDP-Glicose é substrato da *glicogênio sintase*, a enzima que, efetivamente, catalisa a síntese — ela transfere a unidade glicosil de UDP-Glicose para uma das extremidades não redutoras do glicogênio, formando uma ligação  $\alpha$ -1,4:



O UDP é reconvertido a UTP à custa de ATP, pela *nucleosídio difosfato quinase*:



A soma das reações 1 a 6 é:

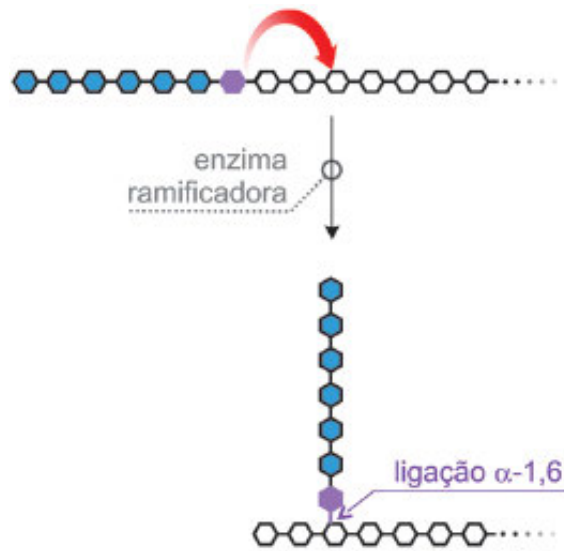


mostrando um gasto de 2 ATP para cada resíduo de glicose incorporado ao glicogênio.

Além da glicogênese, muitos processos biossintéticos contêm reações reversíveis que produzem  $\text{PP}_i$ , incluindo as sínteses de DNA e RNA. O pirofosfato é sempre hidrolisado pela pirofosfatase, uma enzima muito ativa e amplamente distribuída pelos tecidos. Esta hidrólise, altamente irreversível, é um fator importante para impedir a reversibilidade dos processos que produzem pirofosfato.

A glicogênio sintase catalisa apenas a síntese de ligações  $\alpha$ -1,4. As ramificações são feitas pela *enzima ramificadora*, que transfere uma pequena cadeia de 6 ou 7 resíduos de glicose da extremidade para uma parte mais interna da molécula, criando uma ligação  $\alpha$ -1,6 (Figura 13.4). A síntese prossegue por adição de resíduos de glicose às extremidades não redutoras, catalisada pela glicogênio sintase.

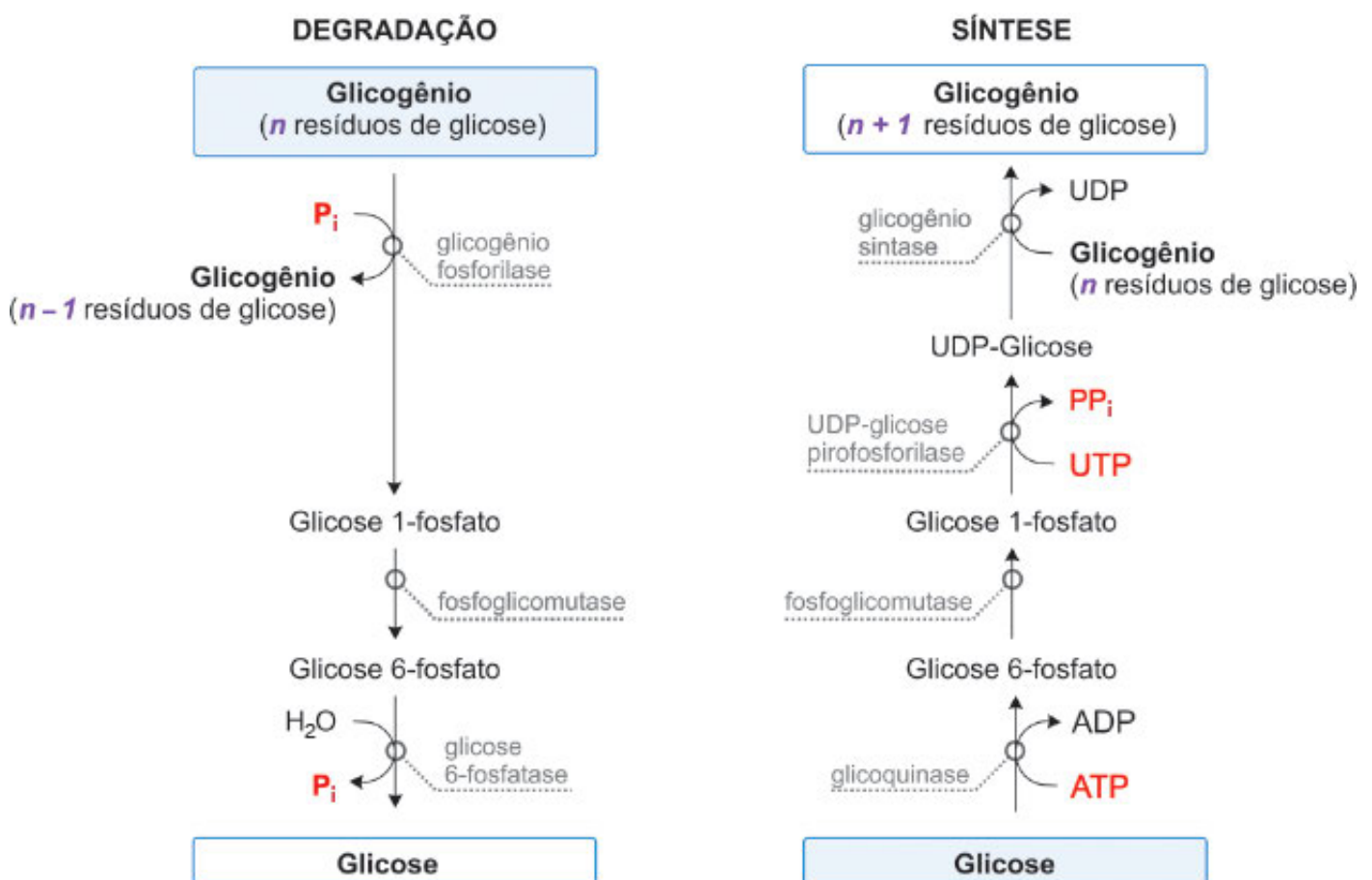
A reação promovida pela glicogênio sintase prevê a existência de uma cadeia de glicogênio já constituída (*primer*), à qual são agregadas novas unidades de glicose — a enzima não é capaz de promover a união das duas primeiras unidades de glicose para iniciar o polímero. Quando, na degradação anterior, não houver permanecido um núcleo de glicogênio que dê suporte para a extensão da cadeia, faz-se necessária a atuação de outra enzima, a *glicogenina*, que catalisa duas reações. Ela inicia a síntese com sua autoglicosilação, transferindo o primeiro resíduo de glicose, derivado de UDP-Glicose, ao grupo OH da cadeia lateral de um dos seus resíduos de tirosina. Em seguida, a glicogenina catalisa a incorporação de novos resíduos de glicose, unidos por ligações  $\alpha$ -1,4 e sempre provenientes de UDP-Glicose, até formar uma pequena cadeia de 10-20 resíduos. Neste momento entra em ação a glicogênio sintase, que prossegue a polimerização, e a glicogenina desliga-se do polímero em crescimento. A glicogenina é uma enzima com atuação pouco usual: é o substrato, o catalisador e o produto da reação.



**Figura 13.4** Formação de uma ramificação da cadeia de glicogênio.

As vias de degradação e síntese do glicogênio hepático estão resumidas na Figura 13.5. No músculo, as reações que interconvertem glicogênio e glicose 6-fosfato são idênticas às do fígado. No entanto, no músculo, a glicose 6-fosfato não pode originar glicose, devido à ausência de glicose 6-fosfatase; além disso, a fosforilação da glicose é feita pela hexoquinase.

 *A regulação do metabolismo do glicogênio hepático e muscular está descrita na Seção 20.1.*



**Figura 13.5** Esquema geral da degradação e síntese de glicogênio no fígado.

### Doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio

São conhecidas várias moléstias hereditárias cuja causa primária é a ausência ou diminuição da atividade de uma das enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio; em 2010, foi descrita uma nova doença, devida a uma mutação no gene da isoforma muscular da glicogenina. Os portadores destas moléstias geralmente apresentam aumento do depósito de glicogênio que, em alguns casos, aparece com estrutura anormal. Nas doenças de acúmulo de glicogênio hepático (GSDs), a hipoglicemia é o primeiro marcador clínico de comprometimento do fígado; nos casos de acúmulo de glicogênio nos

músculos esqueléticos, os sintomas são fraqueza muscular (hipotonia) e câimbras. A Tabela 13.1 apresenta algumas das doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio, indicando a enzima alterada e os principais sintomas observados nos portadores dessas anomalias.

## 13.2 Síntese de amido

O amido é o principal carboidrato de reserva dos vegetais. Geralmente é associado a órgãos de armazenamento, como sementes, raízes e tubérculos (Seção 6.1), mas sua síntese ocorre também nas folhas da maioria das plantas. Ou seja, o amido é um produto primário da fotossíntese, além da sacarose.

Nas folhas, parte do carbono assimilado pelo ciclo de Calvin (Seção 15.4) é retida no cloroplasto e estocada como amido para utilização durante a noite e parte é transportada para o citosol onde origina sacarose. A sacarose é distribuída a outros tecidos, não fotossintéticos, onde pode ser consumida como fonte de energia ou originar polissacarídios de reserva (amido) ou estruturais (celulose, lignina etc.).

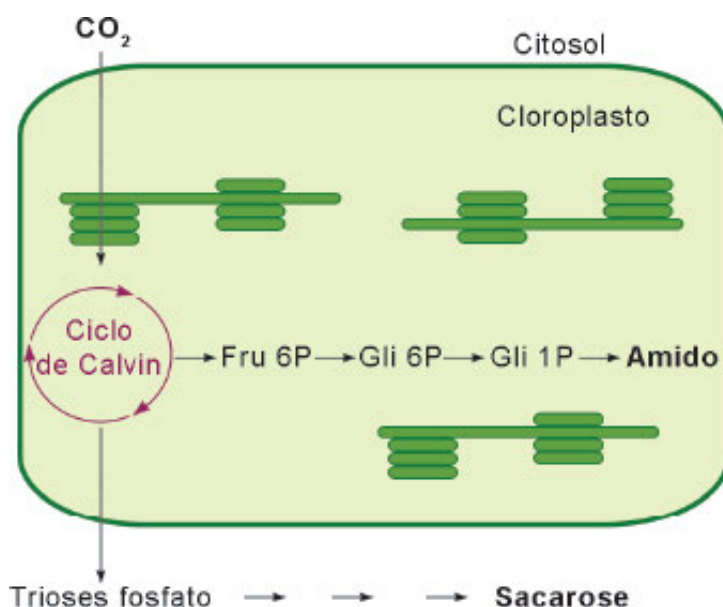
O amido é composto por cadeias lineares de resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha$ -1,4 e cadeias contendo ramificações formadas por ligações  $\alpha$ -1,6 (Seção 6.1). A síntese do amido, similar à do glicogênio, envolve a ação coordenada da *amido sintase*, que catalisa a adição de unidades de glicose às extremidades não redutoras por ligações  $\alpha$ -1,4, e da *enzima ramificadora*, que promove a formação das ligações  $\alpha$ -1,6. A natureza do fragmento iniciador da síntese (*primer*) não é conhecida. O substrato da amido sintase é a forma ativada da glicose, a *adenosina difosfato glicose (ADP-Glicose)*, em vez do UDP-Glicose utilizado pela glicogênio sintase. A produção de ADP-Glicose é catalisada pela *ADP-glicose pirofosforilase*:



A incorporação de glicose ao polímero é catalisada pela amido sintase:

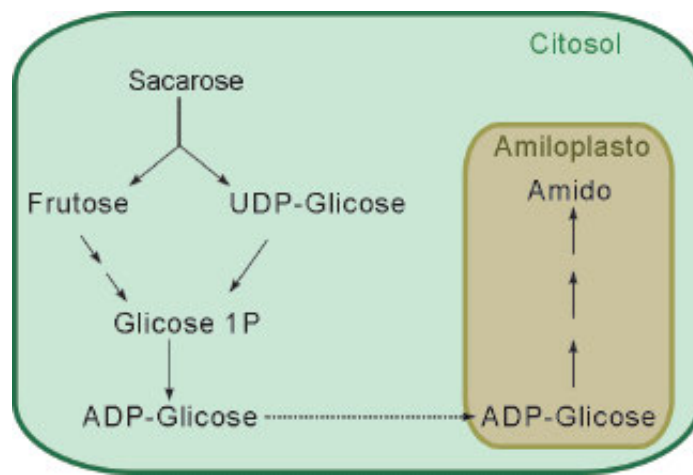


Nos cloroplastos, a glicose 1-fosfato origina-se por isomerização da glicose 6-fosfato formada no ciclo de Calvin e todas as etapas de sua conversão em amido ocorrem nos cloroplastos (Figura 13.6). Nos tecidos não fotossintéticos, de reserva de amido, como tubérculos, sementes etc., a glicose 1-fosfato é derivada da sacarose, proveniente das folhas. Nesses tecidos, a síntese de amido a partir de sacarose compreende uma série de etapas, catalisadas por enzimas do citosol e dos amiloplastos (Figura 13.7).



**Figura 13.6** Nas folhas, o carbono assimilado pelo ciclo de Calvin é utilizado em duas vias de síntese: de amido no cloroplasto e de sacarose no citosol.





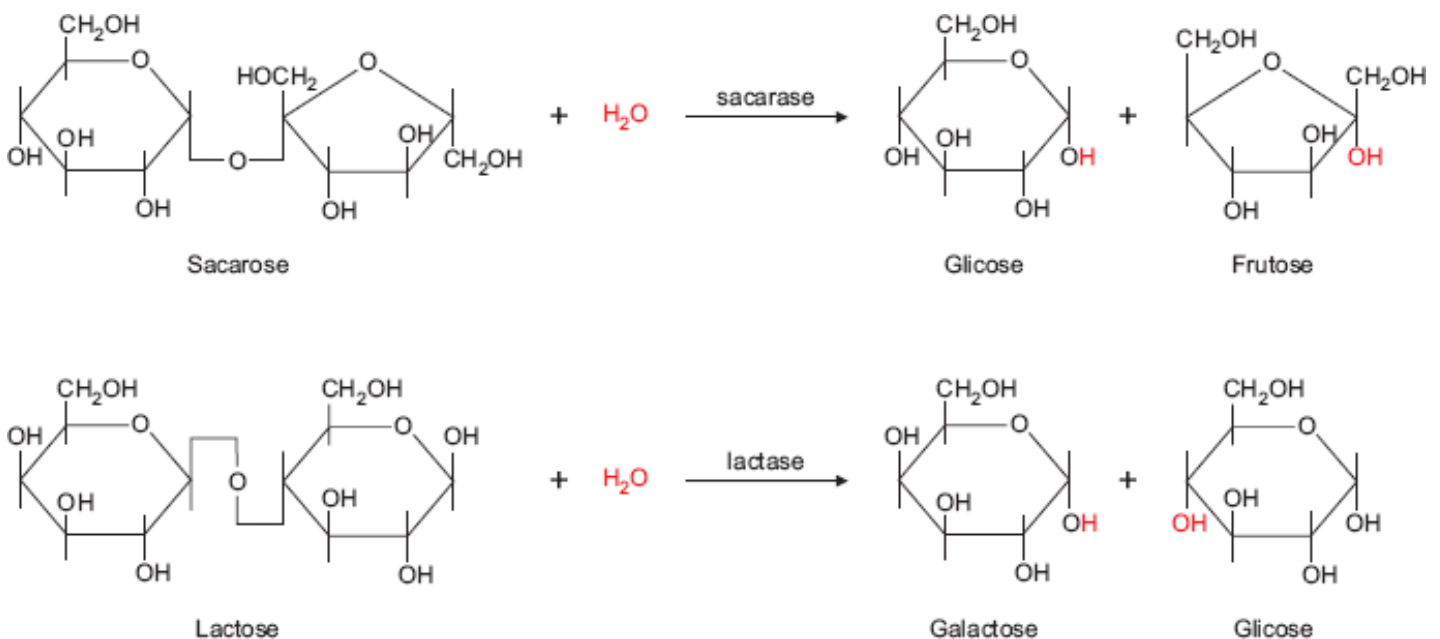
**Figura 13.7** Esquema simplificado da conversão de sacarose em amido nos órgãos de armazenamento (tubérculos, sementes etc.).

A via de síntese de amido envolve a participação, além da sintase e da enzima ramificadora, de uma enzima desramificadora. Sua função seria remover seletivamente ramificações muito curtas e numerosas ou incorretamente posicionadas: a síntese é acompanhada por um processo de correção.

### 13.3 Metabolismo de sacarose e lactose

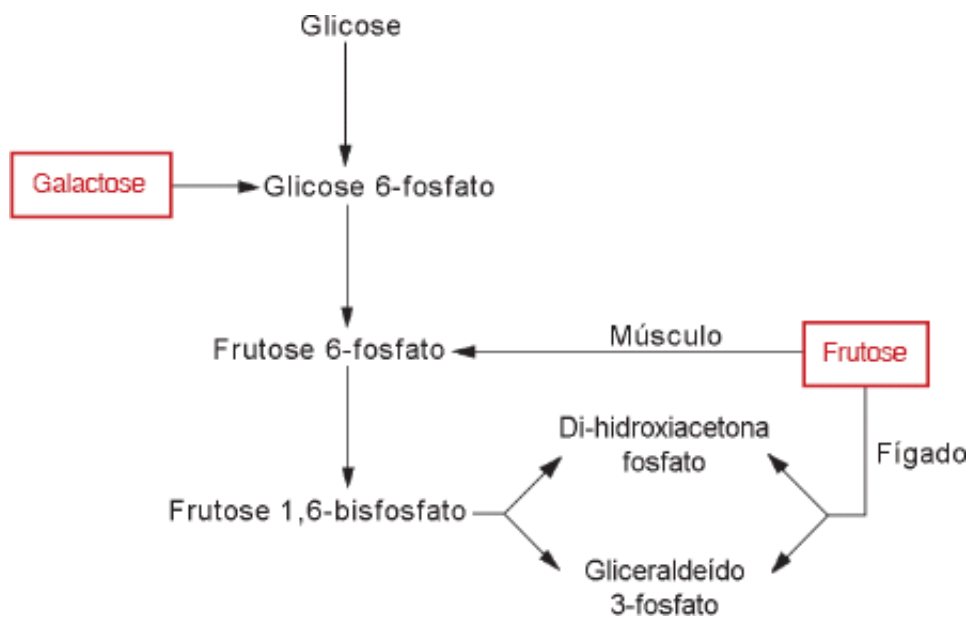
#### Sacarose e lactose originam, além de glicose, frutose e galactose

A sacarose constitui uma fonte quantitativamente importante de energia na dieta humana. A lactose, o principal carboidrato do leite, além de ser fundamental nos primeiros meses de vida, também faz parte da dieta dos adultos, por estar presente nos laticínios. Estes dissacarídeos são hidrolisados no intestino delgado, por *sacarase* e *lactase*, respectivamente (Figura 13.8). A sacarose produz glicose e frutose; a lactose libera glicose e galactose – os monossacarídeos são, então, absorvidos. A deficiência de lactase em indivíduos adultos é relativamente comum, resultando em *intolerância à lactose*: não sendo hidrolisada no intestino delgado, a lactose sofre fermentação bacteriana, que ocasiona flatulência, dor abdominal e diarreia.



**Figura 13.8** Hidrólise de sacarose e lactose.

Frutose e galactose são metabolizadas, em sua maior parte no fígado, por conversão a intermediários da glicólise (Figura 13.9).



**Figura 13.9** Frutose e galactose são metabolizadas pela via glicolítica.

No fígado, a **frutose** é convertida a di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, pelas seguintes reações:



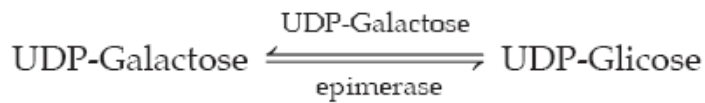
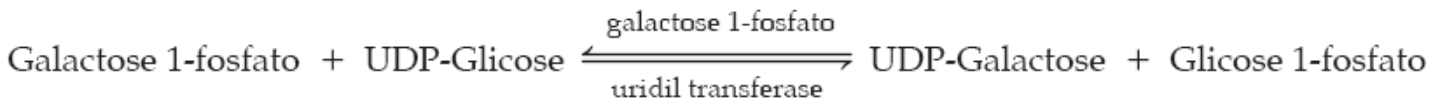
A soma das três reações mostra a transformação de frutose em compostos da via glicolítica:



Em outros tecidos, como adiposo e músculo, que sintetizam hexoquinase, a frutose é convertida a frutose 6-fosfato por esta enzima, ganhando acesso à glicólise:



**Galactose** e glicose são *epímeros*<sup>1</sup> no carbono 4. A transformação de uma das hexoses na outra compreende, entretanto, uma série de reações, uma vez que a epimerização só é feita com os açúcares ligados a UDP:

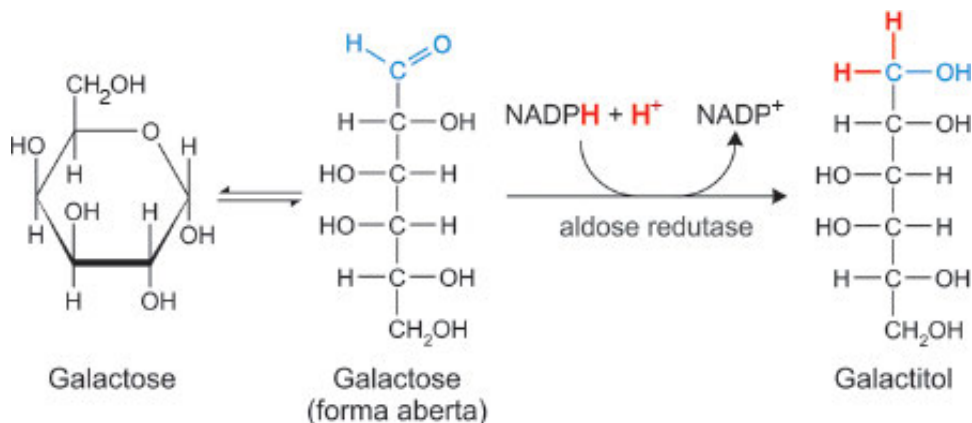


O resultado das quatro reações é a conversão de galactose em glicose 6-fosfato, que pode ser consumida pela via glicolítica:



### A galactosemia resulta do metabolismo anormal da galactose

A deficiência hereditária da *galactose 1-fosfato uridil transferase* provoca uma doença grave, a *galactosemia*, manifestada logo após o nascimento e que compromete o desenvolvimento físico e mental. A impossibilidade de converter galactose em glicose leva à utilização daquele açúcar por vias pouco significativas em indivíduos saudáveis, como a redução a *galactitol*:



O acúmulo de galactitol no cristalino, que tem uma *aldose redutase* muito ativa, leva à catarata. Os efeitos da moléstia podem ser evitados suprimindo precocemente a lactose da dieta. O diagnóstico, que também deve ser precoce, é feito pela dosagem de galactose 1-fosfato uridil transferase nas hemácias.

## Bibliografia

- Carlin MP *et al.*: Determining mutations in G6PC and SLC37A4 genes in a sample of Brazilian patients with glycogen storage disease types Ia and Ib. *Genet Mol Biol* **36** (4): 502-506, 2013.
- Nilsson J *et al.*: Molecular pathogenesis of a new glycogenosis caused by a glycogenin-1 mutation. *Biochim Biophys Acta* **1822** (4): 493-499, 2012.
- Roach PJ *et al.*: Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* **441** (3): 763-787, 2012.
- Tishkoff SA *et al.*: Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* **39**: 31-40, 2007.
- Zeeman SC *et al.*: Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 209-234, 2010.

---

<sup>1</sup>*Epímeros* são açúcares que diferem apenas quanto à configuração de um átomo de carbono.

## QUADRO 15-3



## MEDICINA

## Mutações genéticas que originam formas raras de diabetes (Continuação)

sulina. No MODY2, uma mutação no gene da hexocinase IV (glicocinase) afeta o fígado e o pâncreas, órgãos nos quais esta é a principal isoforma da hexocinase. A glicocinase das células  $\beta$  pancreáticas funciona como sensor de glicose. Normalmente, quando a glicose sanguínea aumenta, aumentam também seus níveis nas células  $\beta$ , sendo que, uma vez que a glicocinase tem um  $K_m$  relativamente alto para a glicose, sua atividade aumenta com a elevação dos níveis de glicose no sangue. O metabolismo da glicose-6-fosfato formada nessa reação eleva o nível de ATP nas células  $\beta$ , e isso causa a liberação de insulina pelo mecanismo mostrado na Figura 23-27. Em pessoas saudáveis, a concentração sanguínea de glicose de  $\sim 5$  mM causa essa liberação do hormônio, mas pessoas com mutações inativantes em ambas as cópias do gene da glicocinase têm limiares muito altos para a liberação da insulina, e em consequência apresentam hiperglicemia severa desde o nascimento – diabetes neonatal permanente. Em pessoas com uma cópia mutada e uma normal, o limiar de glicose para a liberação da insulina se eleva para cerca de 7 mM. Essas pessoas têm níveis

de glicose sanguínea ligeiramente acima do normal: elas geralmente têm hiperglicemia leve e não apresentam outros sintomas. Essa condição (MODY2) geralmente é descoberta por acaso durante análise rotineira de glicose sanguínea.

Existem pelo menos outros cinco tipos de MODY, cada um deles como resultado de mutações inativantes em algum dos fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento normal e a função das células  $\beta$  pancreáticas. As pessoas com essas mutações apresentam redução na produção de insulina e os defeitos associados à homeostasia da glicose sanguínea em graus variados. Em MODY1 e MODY3, os defeitos são suficientemente graves para produzir as complicações de longo prazo associadas com IDDM e NIDDM – problemas cardiovasculares, insuficiência renal e cegueira. MODY4, 5 e 6 são formas menos graves da doença. Em conjunto, as doenças MODY representam uma pequena porcentagem de casos de NIDDM. Pessoas com mutações no próprio gene da insulina também são casos muito raros; elas apresentam defeitos de gravidade variada na sinalização da insulina.

### RESUMO 15.3 Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese

- ▶ A gliconeogênese e a glicólise compartilham sete enzimas que catalisam as reações livremente reversíveis das vias. Nas outras três etapas, a reação direta e a inversa são catalisadas por enzimas diferentes, e esses são os pontos de regulação das duas vias.
- ▶ A hexocinase IV (glicocinase) tem propriedades cinéticas relacionadas com seu papel especial no fígado: liberar glicose para o sangue quando a glicose sanguínea está baixa, além de captar e metabolizar a glicose quando ela estiver alta no sangue.
- ▶ A PFK-1 é inibida alostericamente por ATP e citrato. Na maioria dos tecidos dos mamíferos, incluindo o fígado, a frutose-2,6-bifosfato é um ativador alostérico dessa enzima.
- ▶ A piruvato-cinase é inibida alostericamente por ATP, e a isoenzima do fígado também é inibida por fosforilação dependente de cAMP.
- ▶ A gliconeogênese é regulada no nível da piruvato-carboxilase (ativada por acetil-CoA) e da FBPase-1 (inibida por frutose-2,6-bifosfato e AMP).
- ▶ Para limitar a alternância de substrato entre a glicólise e a gliconeogênese, as duas vias estão sob controle alostérico recíproco, obtido principalmente pelos efeitos opostos da frutose-2,6-bifosfato sobre a PFK-1 e a FBPase-1.
- ▶ O glucagon ou a adrenalina reduzem a [frutose-2,6-bifosfato] pela elevação da [cAMP] e promoção da fosforilação da enzima bifuncional PFK-2/FBPase-2. A insulina aumenta a [frutose-2,6-bifosfato] pela ativação da

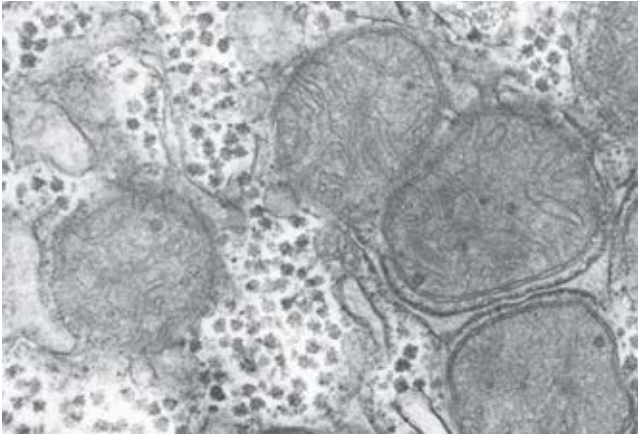
fosfoproteína-fosfatase que desfosforila e assim ativa a PFK-2.

- ▶ A xilulose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses-fosfato, ativa a fosfoproteína-fosfatase PP2A, que desfosforila várias proteínas-alvo, incluindo PFK-2/FBPase-2, deslocando o equilíbrio no sentido da captação de glicose, síntese de glicogênio e síntese de lipídeos no fígado.
- ▶ Os fatores de transcrição ChREBP, CREB, SREBP e FOXO1 agem no núcleo, na regulação da expressão de genes específicos que codificam enzimas das vias glicolítica e gliconeogênica. A insulina e o glucagon atuam antagonicamente na ativação desses fatores, ligando e desligando, dessa forma, um grande número de genes.

## 15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais

A presente discussão sobre a regulação metabólica, usando o metabolismo dos carboidratos como principal exemplo, aborda agora a síntese e a degradação do glicogênio. Esta seção focaliza as vias metabólicas; a Seção 15.5 aborda os mecanismos reguladores.

Nos organismos, desde as bactérias até as plantas e os vertebrados, o excesso de glicose é convertido em formas poliméricas de armazenamento – glicogênio nos vertebrados e em muitos microrganismos, amido nas plantas. Nos vertebrados, o glicogênio é encontrado principalmente no fígado e no músculo esquelético, podendo representar até 10% do peso do fígado e 1 a 2% do peso do músculo. Se toda essa glicose fosse dissolvida no citosol de um hepatócito, sua concentração seria de cerca de 0,4 M, suficiente para influenciar nas propriedades osmóticas da célula. Quando armazenada na forma de um grande polímero (glicogênio),



**FIGURA 15-26 Grânulos de glicogênio em um hepatócito.** O glicogênio, a forma de armazenamento de carboidratos, aparece como partículas eletrodensas, geralmente na forma de agregados ou rosetas. Nos hepatócitos, o glicogênio está intimamente associado com os túbulos do retículo endoplasmático liso. Muitas mitocôndrias também são evidentes nesta micrografia.

contudo, a mesma massa de glicose tem uma concentração de apenas  $0,01 \mu\text{M}$ . O glicogênio é armazenado em grandes grânulos citosólicos. A partícula básica do glicogênio, a partícula  $\beta$ , tem um diâmetro de cerca de 21 nm e consiste em 55.000 resíduos de glicose com cerca de 2.000 extremidades não redutoras. De 20 a 40 dessas partículas se agrupam para formar as rosetas  $\alpha$ , facilmente visíveis ao microscópio em amostras de tecidos de animais bem alimentados (**Figura 15-26**), mas que desaparecem após um jejum de 24 horas.

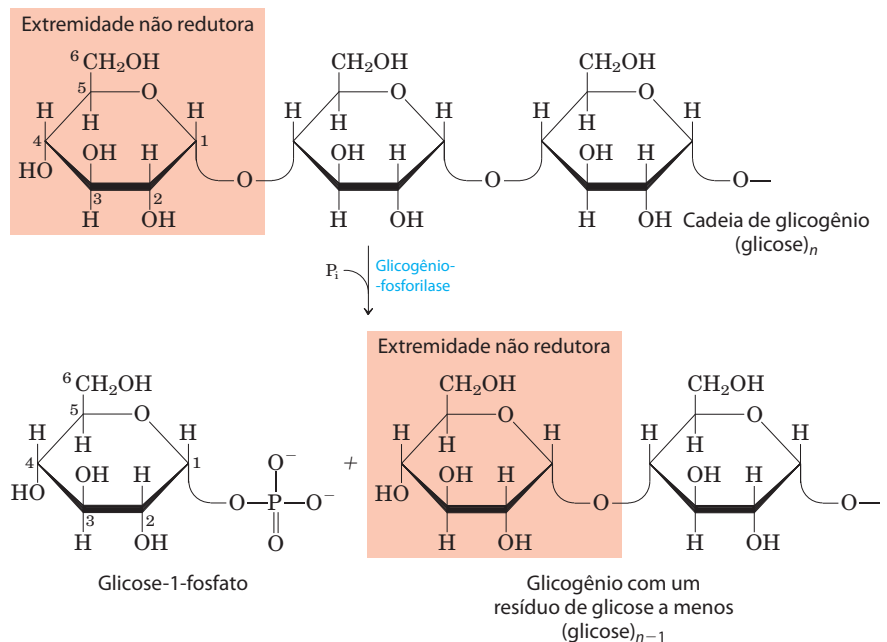
O glicogênio do músculo fornece uma fonte de energia rápida para o metabolismo aeróbio e anaeróbio. O glicogênio muscular pode ser gasto em menos de uma hora durante atividade intensa. O glicogênio hepático serve como um reservatório de glicose para os outros tecidos

quando não há glicose disponível (entre as refeições ou no jejum); isto é especialmente importante para os neurônios do cérebro, que não podem usar ácidos graxos como combustível. O glicogênio do fígado pode ser esaurido de 12 a 24 horas. Nos humanos, a quantidade total de energia armazenada na forma de glicogênio é muito menor do que a quantidade armazenada como gordura (triacilglicerol) (ver Tabela 23-5), mas as gorduras, nos mamíferos, não podem ser convertidas em glicose e não podem ser metabolizadas anaerobiamente.

Os grânulos de glicogênio são agregados complexos de glicogênio mais as enzimas que os sintetizam e os degradam, assim como a maquinaria de regulação dessas enzimas. Os mecanismos gerais de armazenamento e mobilização do glicogênio são os mesmos no músculo e no fígado, mas as enzimas diferem em aspectos sutis, mas importantes, que refletem os papéis diferentes do glicogênio nesses dois tecidos. O glicogênio também é obtido da dieta e degradado no intestino, e isso envolve um conjunto separado de enzimas hidrolíticas que convertem glicogênio em glicose livre. (O amido da dieta é hidrolisado de forma semelhante.) A presente discussão se inicia com a degradação do glicogênio em glicose-1-fosfato (**glicogenólise**) e em seguida aborda a sua síntese (**glicogênese**).

### A degradação do glicogênio é catalisada pela glicogênio-fosforilase

No músculo esquelético e no fígado, as unidades de glicose das ramificações externas do glicogênio entram na via glicolítica pela ação de três enzimas: glicogênio-fosforilase, enzima de desramificação do glicogênio e fosfoglicomutase. A glicogênio-fosforilase catalisa a reação na qual uma ligação glicosídica ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) entre dois resíduos de glicose em uma extremidade não redutora do glicogênio é atacada por um fosfato inorgânico ( $P_i$ ), removendo o resíduo terminal na forma de  $\alpha$ -D-glicose-1-fosfato (**Figura 15-27**). Essa



**FIGURA 15-27 Remoção, pela glicogênio-fosforilase, de um resíduo de glicose da extremidade não redutora de uma cadeia de glicogênio.** Este processo é repetitivo; a enzima remove sucessivos resíduos de glicose até que alcance a quarta unidade de glicose antes de um ponto de ramificação (ver Figura 15-28).



reação de *fosforólise* é diferente da *hidrólise* das ligações glicosídicas pela amilase durante a degradação intestinal do glicogênio e do amido da dieta. Na fosforólise, parte da energia da ligação glicosídica é preservada pela formação do éster de fosfato, glicose-1-fosfato (ver Seção 14.2).

O piridoxal-fosfato é um cofator essencial na reação da glicogênio-fosforilase; seu grupo fosfato atua como catalisador ácido geral, promovendo o ataque pelo  $P_i$  sobre a ligação glicosídica. (Esse papel do piridoxal-fosfato é incomum; seu papel mais característico é o de cofator no metabolismo dos aminoácidos; ver Figura 18-6.)

A glicogênio-fosforilase age repetidamente sobre as extremidades não redutoras das ramificações do glicogênio até que alcance um ponto a quatro resíduos de glicose de um ponto de ramificação ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) (ver Figura 7-13), onde interrompe sua ação. A degradação pela glicogênio-fosforilase continua somente depois que a **enzima de desramificação**, conhecida formalmente como **oligo ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) a ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) glican-transferase**, catalisa duas reações sucessivas que removem as ramificações (Figura 15-28). Logo que as ramificações são removidas e o resíduo glicosil na posição C-6 é hidrolisado, a atividade da glicogênio-fosforilase pode continuar.

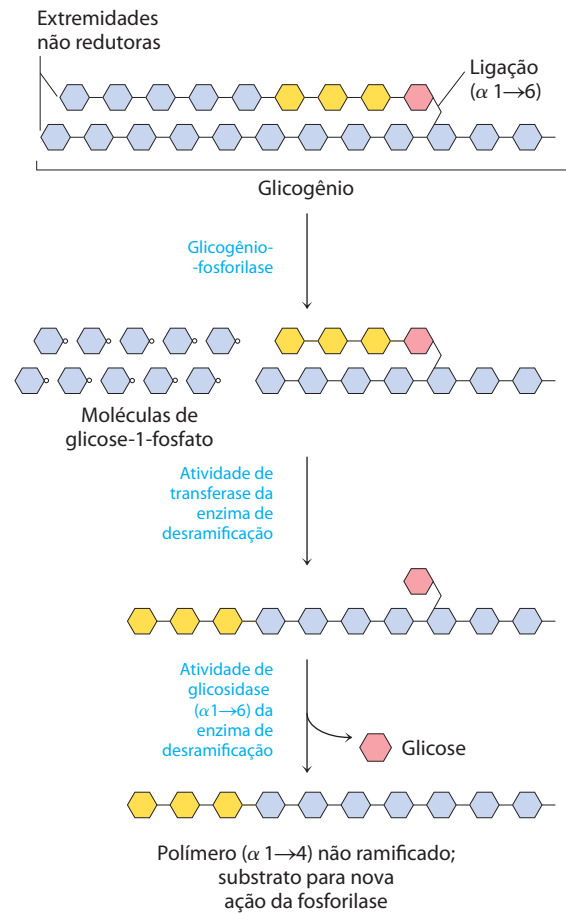
**A glicose-1-fosfato pode entrar na glicólise ou, no fígado, repor a glicose sanguínea**

A glicose-1-fosfato, o produto final da reação da glicogênio-fosforilase, é convertida em glicose-6-fosfato pela **fosfoglicomutase**, que catalisa a reação reversível

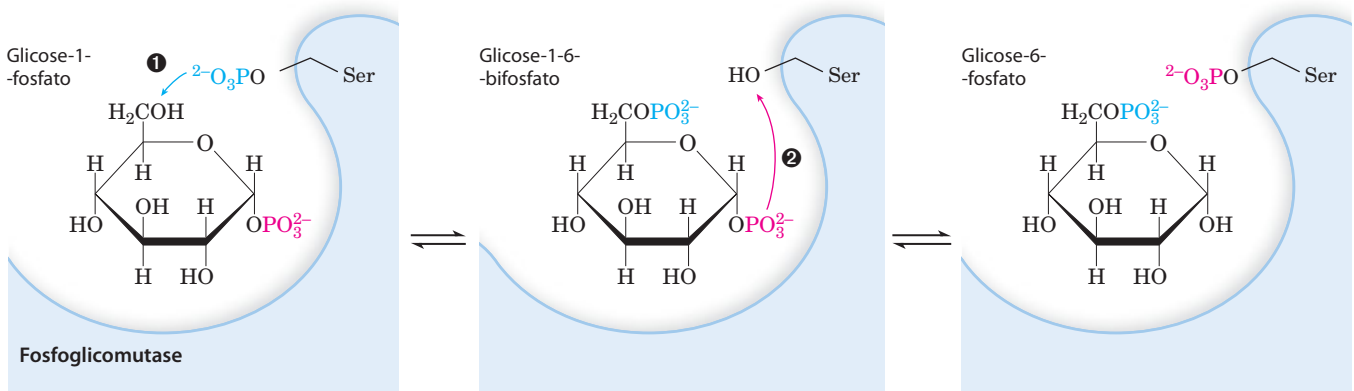


A enzima, inicialmente fosforilada em um resíduo de Ser, doa um grupo fosforil ao C-6 do substrato e aceita um grupo fosforil do C-1 (Figura 15-29).

A glicose-6-fosfato formada no músculo esquelético a partir do glicogênio pode entrar na glicólise e serve como fonte de energia para a contração muscular. No fígado, a degradação do glicogênio serve a um propósito diferente: liberar glicose para o sangue quando o nível de glicose sanguínea diminui, como acontece entre as refeições. Isso requer

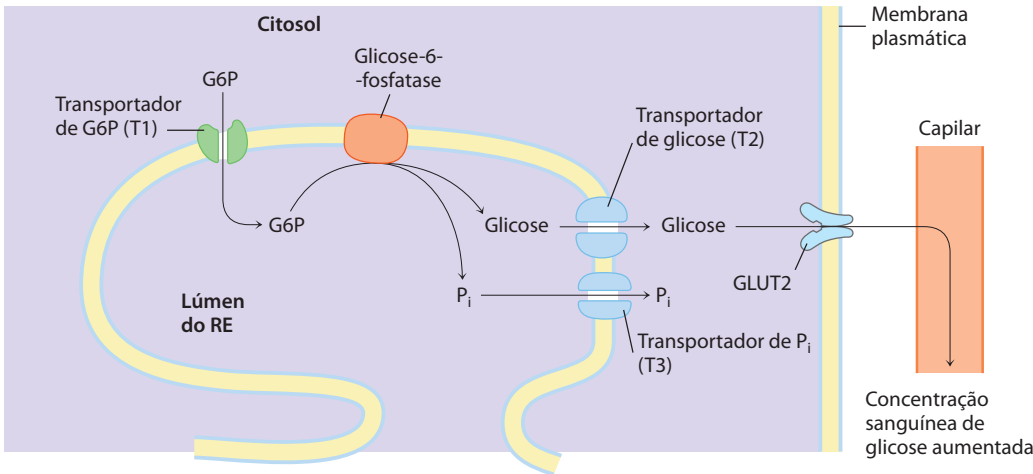


**FIGURA 15-28 Degradação do glicogênio próximo a um ponto de ramificação ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ).** Seguindo-se à remoção sequencial dos resíduos terminais de glicose pela glicogênio-fosforilase (ver Figura 15-27), os resíduos próximos a uma ramificação são removidos por um processo em duas etapas que requer a enzima de desramificação bifuncional. Na primeira, a atividade de transferase da enzima remove um bloco de três resíduos de glicose da ramificação para uma extremidade não redutora próxima, à qual é religado por uma ligação ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ). O resíduo remanescente no ponto de ramificação, em ligação ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ), é então liberado como glicose livre pela atividade de glicosidase ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) da enzima de desramificação. Os resíduos de glicose são mostrados na forma condensada que omite os grupos  $\text{—H}$ ,  $\text{—OH}$  e  $\text{—CH}_2\text{OH}$  dos anéis piranosídicos.



**FIGURA 15-29 A reação catalisada pela fosfoglicomutase.** A reação começa com a enzima fosforilada em um resíduo de Ser. Na etapa 1, a enzima doa seu grupo fosforil (em azul) para a glicose-1-fosfato, produzindo

glicose-1-6-bifosfato. Na etapa 2, o grupo fosforil no C-1 da glicose-1-6-bifosfato (em vermelho) é transferido de volta para a enzima, restaurando a fosfoenzima e produzindo glicose-6-fosfato.



**FIGURA 15-30 Hidrólise da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfatase do retículo endoplasmático (RE).** O sítio catalítico da glicose-6-fosfatase está voltado para o lúmen do RE. Um transportador (T1) de glicose-6-fosfato (G6P) leva o substrato do citosol para o lúmen, e os produtos, glicose e  $P_i$ , passam para o citosol por meio de transportadores específicos (T2 e T3). A glicose deixa a célula via transportador GLUT2 da membrana plasmática.

a presença da enzima glicose-6-fosfatase no fígado e no rim, mas não em outros tecidos. A enzima é uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático, contendo, preditivamente, nove hélices transmembrana, com seu sítio ativo no lado luminal do retículo. A glicose-6-fosfato formada no citosol é transportada para o lúmen do retículo por um transportador específico (T1) (Figura 15-30) e hidrolisada na superfície luminal pela glicose-6-fosfatase. Acredita-se que os produtos resultantes,  $P_i$  e glicose, sejam transportados de volta para o citosol por dois transportadores diferentes (T2 e T3), e a glicose deixa o hepatócito pelo transportador GLUT2 na membrana plasmática. Observe que, por ter o sítio ativo da enzima no lúmen do retículo, a célula separa essa reação do processo de glicólise que acontece no citosol e poderia ser abortado pela ação da glicose-6-fosfatase. Defeitos genéticos na glicose-6-fosfatase ou no T1 levam a perturbações sérias no metabolismo do glicogênio, resultando na doença de depósito de glicogênio tipo Ia (Quadro 15-4).

O músculo e o tecido adiposo não conseguem converter a glicose-6-fosfato formada pela degradação do glicogênio em glicose, pois não têm a enzima glicose-6-fosfatase; por isso, esses tecidos não fornecem glicose para o sangue.

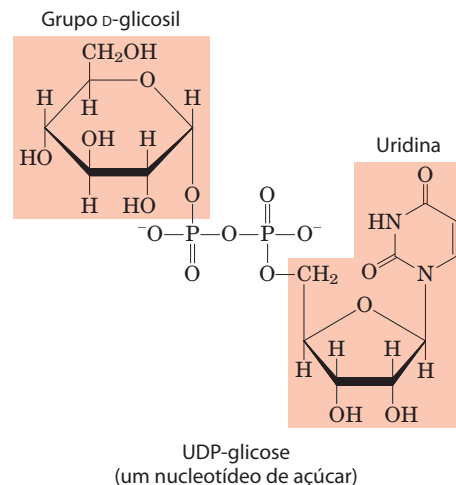
### O nucleotídeo de açúcar UDP-glicose doa glicose para a síntese do glicogênio



Luis Leloir, 1906-1987

Muitas das reações pelas quais as hexoses são transformadas ou polimerizadas envolvem **nucleotídeos de açúcar**, compostos nos quais o carbono anômero do açúcar é ativado pela união a um nucleotídeo por meio de uma ligação éster de fosfato. Os nucleotídeos de açúcar são os substratos para a polimerização de monossacarídeos em dissacarídeos, glicogênio, amido, celulose e polissacarídeos extracelulares mais complexos. Também são intermediários-chave na produção das amino-

-hexoses e desoxi-hexoses, encontradas em alguns desses polissacarídeos, e na síntese da vitamina C (ácido L-ascórbico). O papel dos nucleotídeos de açúcar na biossíntese do glicogênio e em muitos outros derivados de carboidratos foi descoberto em 1953 pelo bioquímico argentino Luis Leloir.




A adequação dos nucleotídeos de açúcar para as reações biossintéticas tem origem em várias propriedades:

1. Sua formação é metabolicamente irreversível, contribuindo para a irreversibilidade das vias biossintéticas em que são intermediários. A condensação de um nucleosídeo-trifosfato com uma hexose-1-fosfato para formar um nucleotídeo de açúcar tem uma pequena variação de energia livre positiva, mas a reação libera  $PP_i$ , que é rapidamente hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica (Figura 15-31), em uma reação fortemente exergônica ( $\Delta G'^{\circ} = 19,2 \text{ kJ/mol}$ ). Isso mantém baixa a concentração de  $PP_i$ , garantindo que, na célula, a variação de energia livre real seja vantajosa. De fato, a remoção rápida do produto, conduzida pela grande variação de energia livre negativa da hidrólise de  $PP_i$ , impulsiona a reação sintética para

**QUADRO 15-4 Carl e Gerty Cori: pioneiros no metabolismo e nas doenças do armazenamento do glicogênio**

Muito do que está escrito nos livros-texto atuais de bioquímica sobre o metabolismo do glicogênio foi descoberto entre 1925 e 1950 pelo admirável casal Carl F. Cori e Gerty T. Cori. Ambos se formaram em medicina na Europa no final da I Guerra Mundial (ela completou os estudos pré-médicos e a escola de medicina em um ano!). Eles deixaram a Europa juntos em 1922 e estabeleceram laboratórios de pesquisa nos Estados Unidos, primeiro por nove anos em Buffalo, Nova York, onde é hoje o Roswell Park Memorial Institute, e de 1931 até o final de suas vidas, na Universidade de Washington, em St. Louis.

Nos seus estudos fisiológicos iniciais sobre a origem e o destino do glicogênio no músculo dos animais, os Cori demonstraram a conversão do glicogênio em lactato no tecido, o deslocamento do lactato pelo sangue para o fígado, e sua reconversão aí em glicogênio – rota que se tor-

nou conhecida como o ciclo de Cori (ver Figura 23-19). Seguindo essas informações no nível bioquímico, o casal mostrou que o glicogênio era mobilizado em uma reação de fosforólise catalisada pela enzima descoberta por eles, a glicogênio-fosforilase. Os Cori identificaram o produto dessa reação (o “éster de Cori”) como glicose-1-fosfato e mostraram que esse produto podia ser reincorporado em glicogênio pela reação inversa. Embora isso não provasse que essa era a reação usada pelas células para sintetizar glicogênio, foi a primeira demonstração “*in vitro*” da síntese de uma macromolécula a partir de subunidades monoméricas simples, o que inspirou outros a procurar enzimas polimerizadoras. Arthur Kornberg, descobridor da primeira DNA-polimerase, falou sobre sua experiência no laboratório dos Cori: “Foi a glicogênio-fosforilase, e não o pareamento de bases, que me levou à DNA-polimerase”. Gerty Cori passou a se interessar por doenças genéticas humanas nas quais o fígado armazenava um excesso de glicogênio. Ela conseguiu identificar o defeito bioquímico  de várias dessas doenças e mostrou que elas podiam ser diagnosticadas por meio de testes das enzimas do metabolismo do glicogênio em pequenas amostras de tecidos obtidas por biópsias. A Tabela Q-1 resume o conhecimento atual sobre 13 doenças genéticas desse tipo. ■

Carl e Gerty compartilharam o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1947 com Bernardo Houssay, da Argentina, que foi premiado por seus estudos sobre a regulação hormonal do metabolismo dos carboidratos. Os laboratórios Cori em St. Louis se tornaram um centro internacional de pesquisa bioquímica nas décadas de 1940 e 1950, e pelo menos seis cientistas que estudaram com os Cori receberam o Nobel: Arthur Kornberg (pela síntese do DNA, 1959), Severo Ochoa (pela síntese do RNA, 1959), Luis Leloir (pelo papel dos nucleotídeos de açúcar na síntese dos polissacarídeos, 1970), Earl Sutherland (pela descoberta do cAMP na regulação do metabolismo dos carboidratos, 1971), Christian de Duve (pelo fracionamento subcelular, 1974) e Edwin Krebs (pela descoberta da fosforilase-cinase, 1991).



Os Cori no laboratório de Gerty Cori, por volta de 1947.

- a frente, estratégia comum nas reações biológicas de polimerização.
- Embora as transformações químicas dos nucleotídeos de açúcar não envolvam os átomos do próprio nucleotídeo, essa parte da molécula tem muitos grupos que podem interagir covalentemente com enzimas; a energia livre adicional de ligação pode contribuir de modo significativo para a atividade catalítica (Capítulo 6; ver também p. 306-307).
- Assim como o fosfato, o grupo nucleotídil (p. ex., UMP ou AMP) é um excelente grupo de fácil elimi-

nação, facilitando o ataque nucleofílico pela ativação do carbono do açúcar ao qual está ligado.

- Pela “marcação” de algumas hexoses com grupos nucleotídil, as células podem deixá-las confinadas em um reservatório para uma finalidade (p. ex., síntese de glicogênio), separadas das hexoses-fosfato destinadas a outra finalidade (como a glicólise).

A síntese do glicogênio ocorre em quase todos os tecidos animais, mas é mais importante no fígado e no músculo esquelético. O ponto de partida para a síntese do glicogênio

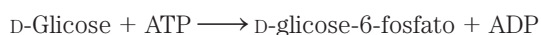
TABELA Q-1



Doenças do armazenamento de glicogênio em humanos

Tipo (nome)	Enzima afetada	Principal órgão afetado	Sintomas
Tipo 0	Glicogênio-sintase	Fígado	Glicose sanguínea baixa, corpos cetônicos altos, morte prematura
Tipo Ia (von Gierke)	Glicose-6-fosfatase	Fígado	Fígado aumentado, insuficiência renal
Tipo Ib	Glicose-6-fosfato-translocase microsomal	Fígado	Como em Ia; também suscetibilidade alta a infecções bacterianas
Tipo Ic	Transportador microsomal de P <sub>i</sub>	Fígado	Como em Ia
Tipo II (Pompe)	Glicosidase lisossomal	Músculo cardíaco e esquelético	Forma infantil: morte aos 2 anos; forma juvenil: defeitos musculares (miopatia); forma adulta: como na distrofia muscular
Tipo IIIa (Cori ou Forbes)	Enzima de desramificação	Fígado, músculo cardíaco e esquelético	Aumento do fígado em crianças; miopatia
Tipo IIIb	Enzima de desramificação hepática (enzima normal no músculo)	Fígado	Aumento do fígado em crianças
Tipo IV (Andersen)	Enzima de ramificação	Fígado, músculo esquelético	Fígado e pâncreas aumentados, mioglobina na urina
Tipo V (McArdle)	Fosforilase do músculo	Músculo esquelético	Cãibras induzidas pelo exercício e dor; mioglobina na urina
Tipo VI (Hers)	Fosforilase do fígado	Fígado	Fígado aumentado
Tipo VII (Tarui)	PFK-1 do músculo	Músculo, eritrócitos	Como no tipo V; também anemia hemolítica
Tipo VIb, VIII ou IX	Fosforilase-cinase	Fígado, leucócitos, músculo	Fígado aumentado
Tipo XI (Fanconi-Bickel)	Transportador de glicose (GLUT2)	Fígado	Deficiência no desenvolvimento, fígado aumentado, raquitismo, disfunção renal

é a glicose-6-fosfato. Como foi visto, esta pode ser derivada da glicose livre em uma reação catalisada pelas isoenzimas hexocinase I e hexocinase II no músculo e hexocinase IV (glicocinase) no fígado:



No entanto, parte da glicose ingerida faz uma via mais indireta para o glicogênio. Ela é captada primeiro pelos eritrócitos e transformada glicolicamente em lactato, que é captado pelo fígado e convertido em glicose-6-fosfato pela gliconeogênese.

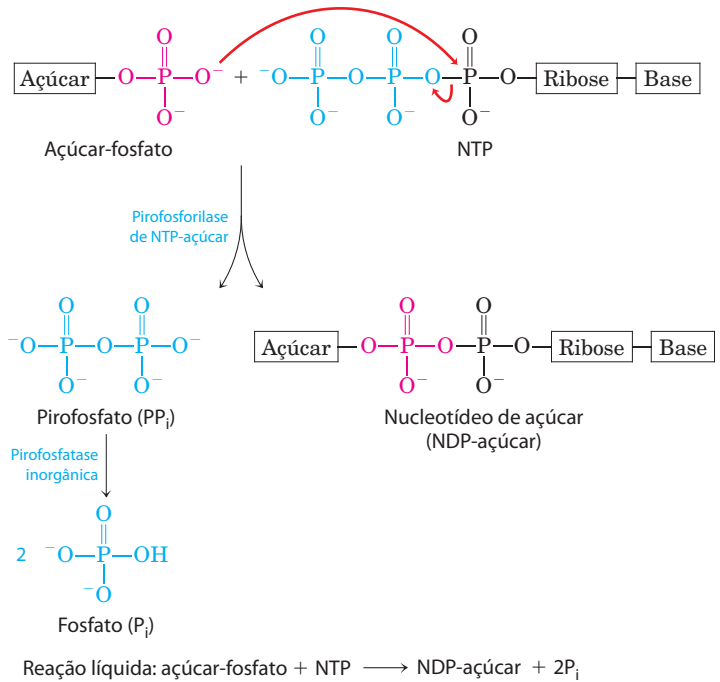
Para iniciar a síntese do glicogênio, a glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato na reação da fosfoglicomutase:



O produto desta reação é convertido em UDP-glicose pela ação da **UDP-glicose-pirofosforilase**, em uma etapa fundamental da biossíntese do glicogênio:



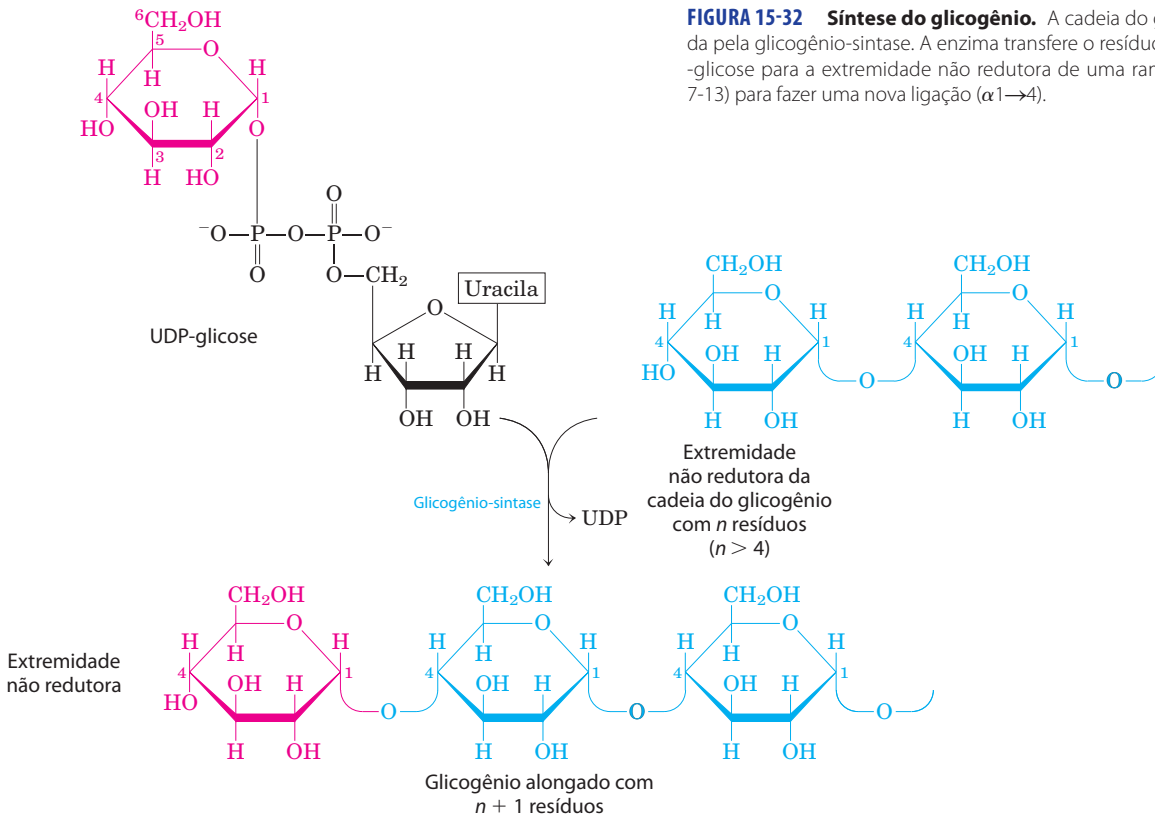
**FIGURA 15-31 Formação de um nucleotídeo de açúcar.** Ocorre uma reação de condensação entre um nucleosídeo-trifosfato (NTP) e um açúcar-fosfato. O oxigênio carregado negativamente no açúcar-fosfato serve como nucleófilo, atacando o fosfato α do nucleosídeo-trifosfato e deslocando pirofosfato. A hidrólise de PP<sub>i</sub> pela pirofosfatase inorgânica impulsiona a reação para a frente.



Observe que essa enzima é denominada pela reação inversa; na célula, a reação ocorre no sentido da formação da UDP-glicose, porque o pirofosfato é hidrolisado rapidamente pela pirofosfatase inorgânica (Figura 15-31).

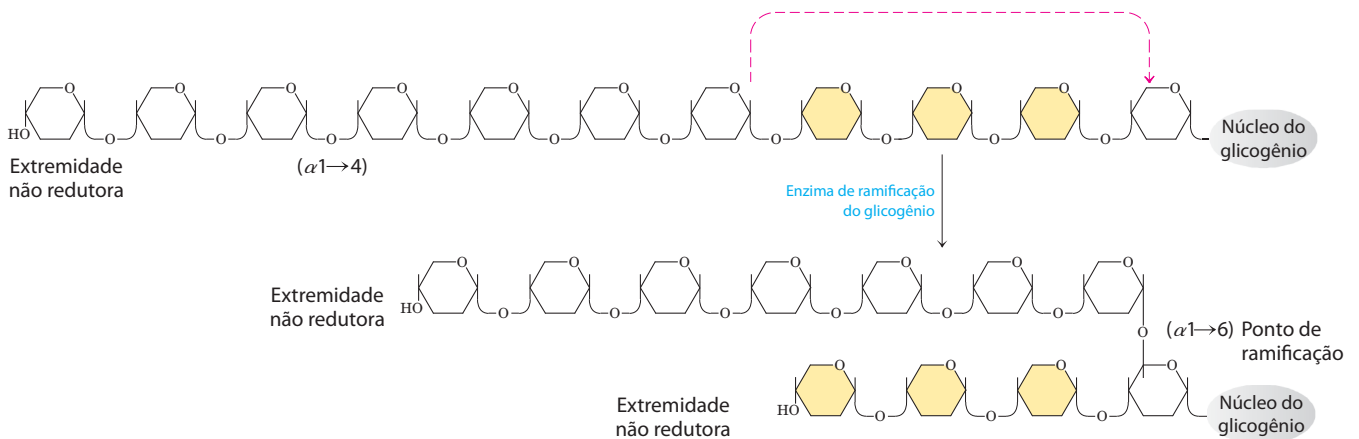
A UDP-glicose é o doador imediato dos resíduos de glicose na reação catalisada pela **glicogênio-sintase**,

que promove a transferência da glicose da UDP-glicose para uma extremidade não redutora de uma molécula ramificada de glicogênio (Figura 15-32). O equilíbrio total da via desde a glicose-6-fosfato até o glicogênio acrescido de uma unidade de glicose favorece muito a síntese do polímero.



**FIGURA 15-32 Síntese do glicogênio.** A cadeia do glicogênio é alongada pela glicogênio-sintase. A enzima transfere o resíduo de glicose da UDP-glicose para a extremidade não redutora de uma ramificação (ver Figura 7-13) para fazer uma nova ligação ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ).





**FIGURA 15-33 Síntese da ramificação do glicogênio.** A enzima de ramificação do glicogênio (também chamada de amilo-[1→4]-[1→6]-transglicil-

cosilase, ou glicosil-[4→6]-transferase) forma um novo ponto de ramificação durante a síntese do glicogênio.

A glicogênio-sintase não pode formar as ligações  $(\alpha 1 \rightarrow 6)$  encontradas nos pontos de ramificação do glicogênio, as quais são formadas pela enzima de ramificação, também chamada de **amilo (1→4) a (1→6) transglicosilase**, ou glicosil-(4→6)-transferase. A enzima de ramificação do glicogênio catalisa a transferência de um fragmento terminal de 6 a 7 resíduos de glicose da extremidade não redutora de uma ramificação de glicogênio, contendo pelo menos 11 resíduos, para o grupo hidroxil C-6 de um resíduo de glicose em uma posição mais interna da mesma ou de outra cadeia de glicogênio, criando assim uma nova ramificação (**Figura 15-33**). Resíduos adicionais de glicose podem ser ligados à nova ramificação pela glicogênio-sintase. O efeito biológico da ramificação é tornar a molécula mais solúvel e aumentar o número de sítios acessíveis à glicogênio-fosforilase e à glicogênio-sintase, as quais agem somente nas extremidades não redutoras.

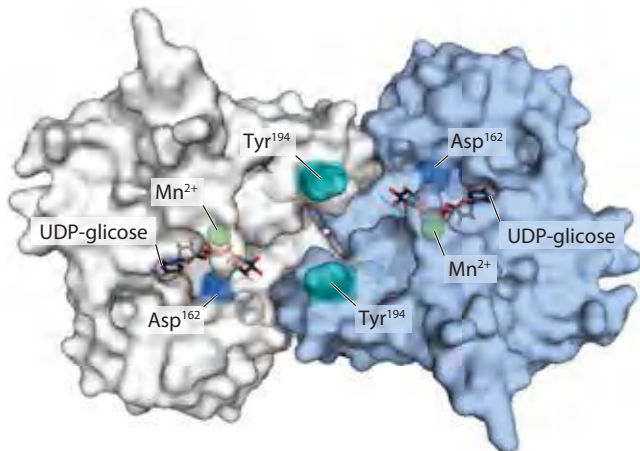
### A glicogenina prepara os resíduos iniciais de glicose no glicogênio

A glicogênio-sintase não consegue iniciar uma cadeia de glicogênio “de novo”. Ela necessita de um iniciador, geralmente uma cadeia poliglicosídica em  $(\alpha 1 \rightarrow 4)$  ou uma

ramificação que tenha, pelo menos, oito resíduos de glicose. Então, como se inicia uma *nova* molécula de glicogênio? A intrigante proteína **glicogenina** (**Figura 15-34**) é ao mesmo tempo o iniciador, sobre o qual são montadas novas cadeias, e a enzima que catalisa essa montagem. A primeira etapa na síntese de uma nova molécula de glicogênio é a transferência de um resíduo de glicose da UDP-glicose para o grupo hidroxil da Tyr<sup>194</sup> da glicogenina, catalisada pela atividade glicosil-transferase intrínseca da proteína (**Figura 15-35**). A cadeia nascente se alonga pela adição sequencial de mais sete resíduos de glicose, cada um derivado de uma UDP-glicose; as reações são catalisadas pela atividade de extensão de cadeia da glicogenina. Neste ponto, a glicogênio-sintase age, alongando ainda mais a cadeia de glicogênio. A glicogenina permanece escondida dentro da partícula  $\beta$ , unida covalentemente à única extremidade redutora da molécula de glicogênio (**Figura 15-35b**). As consequências clínicas de uma mutação no gene da glicogenina que suprime essa atividade de polimerização da proteína incluem fadiga muscular e fraqueza, depleção do glicogênio no fígado e batimento cardíaco irregular (arritmia cardíaca).

### RESUMO 15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais

- ▶ O glicogênio é armazenado no músculo e no fígado sob a forma de grandes partículas. Dentro das partículas es-



**FIGURA 15-34 Estrutura da glicogenina.** (PDB 1D 1LL2) A glicogenina muscular ( $M_r$  37.000) forma dímeros em solução. Os humanos têm uma segunda isoforma no fígado, glicogenina-2. O substrato, UDP-glicose, está ligado a uma estrutura de Rossmann próximo da extremidade aminoterminal e a alguma distância do resíduo de Tyr<sup>194</sup> – 15 Å da Tyr no mesmo monômero, 12 Å da Tyr no parceiro dimérico. Cada UDP-glicose está ligada por meio de seus fosfatos a um íon de Mn<sup>2+</sup> que é essencial para a catálise. Acredita-se que o Mn<sup>2+</sup> atue como aceptor de pares de elétrons (ácido de Lewis) para estabilizar o grupo de fácil eliminação UDP. A ligação glicosídica no produto tem a mesma configuração no C-1 da glicose que no substrato UDP-glicose, sugerindo que a transferência da glicose do UDP para a Tyr<sup>194</sup> ocorra em duas etapas. A primeira provavelmente é um ataque nucleofílico pela Asp<sup>162</sup>, formando um intermediário temporário com a configuração invertida. Um segundo ataque nucleofílico pela Tyr<sup>194</sup> restabelece a configuração inicial.





por fosforilação reversível. Ela foi também uma das primeiras enzimas alostéricas cuja estrutura tridimensional detalhada das formas ativa e inativa foi esclarecida por estudos de cristalografia por raios X. A glicogênio-fosforilase é também outro exemplo de como as isoenzimas desempenham seu papel tecido-específico.

### A glicogênio-fosforilase tem regulação alostérica e hormonal



Earl W. Sutherland, Jr., 1915-1974

No final de 1930, Carl e Gerty Cori (Quadro 15-4) descobriram que a glicogênio-fosforilase do músculo esquelético existe em duas formas interconversíveis: **glicogênio-fosforilase a**, cataliticamente ativa, e **glicogênio-fosforilase b**, menos ativa (Figura 15-36). Estudos subsequentes feitos por Earl Sutherland mostraram que a fosforilase b predomina no músculo em repouso, mas que durante uma atividade muscular vigorosa a adrenalina desencadeia a fosforilação de um resíduo específico de

Ser na fosforilase b, convertendo-a em sua forma mais ativa, fosforilase a. (Observe que a glicogênio-fosforilase com frequência é referida simplesmente como fosforilase – muito respeitada por ter sido a primeira fosforilase a ser desco-

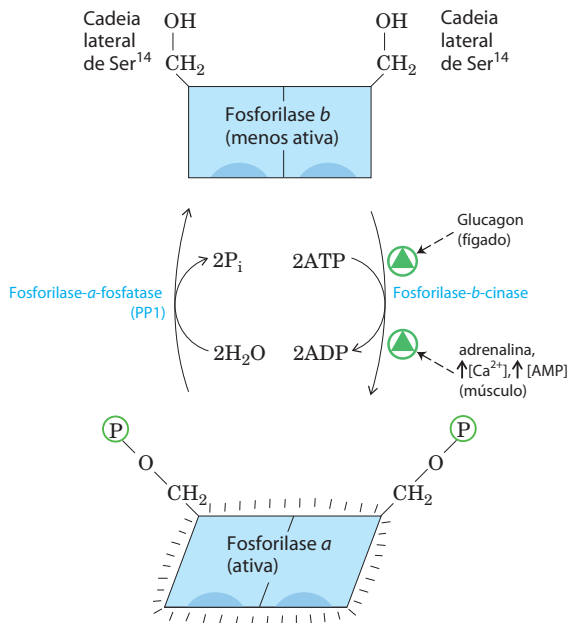
berta; o nome reduzido tem persistido no uso generalizado e na literatura.)

A enzima (fosforilase-b-cinase) responsável pela ativação da fosforilase pela transferência de um grupo fosforil para seu resíduo de Ser é, ela própria, ativada por adrenalina ou glucagon por uma série de etapas mostradas na Figura 15-37. Sutherland descobriu o segundo mensageiro cAMP, cuja concentração aumenta em resposta ao estímulo pela adrenalina (no músculo) ou pelo glucagon (no fígado). Concentrações elevadas de cAMP iniciam uma **cascata enzimática**, na qual um catalisador ativa um segundo catalisador que ativa mais um catalisador (ver Seção 12.1). Tais cascatas permitem uma grande amplificação do sinal inicial (ver retângulos em cor-de-rosa na Figura 15-37). O aumento da [cAMP] ativa a proteína-cinase dependente de cAMP, também chamada de proteína-cinase A (PKA). Por sua vez, a PKA fosforila e ativa a **fosforilase-b-cinase**, que catalisa a fosforilação dos resíduos de Ser nas duas subunidades idênticas da glicogênio-fosforilase, ativando-a e estimulando, assim, a degradação do glicogênio. No músculo, isso fornece combustível para a glicólise sustentar a contração muscular para a resposta de luta ou fuga sinalizada pela adrenalina. No fígado, a degradação do glicogênio age contra a baixa glicose sanguínea sinalizada pelo glucagon, liberando glicose. Essas diferentes funções se refletem em diferenças sutis nos mecanismos reguladores no músculo e no fígado. As glicogênio-fosforilases do fígado e do músculo são isoenzimas, codificadas por genes diferentes, e diferem em suas propriedades reguladoras.

No músculo, há dois mecanismos alostéricos de controle que se sobrepõem à regulação da fosforilase por modificação covalente (Figura 15-37). O  $Ca^{2+}$ , o sinal para a contração muscular, se liga à fosforilase-b-cinase, ativando-a, promovendo a conversão da fosforilase b para sua forma ativa a. O  $Ca^{2+}$  se liga à subunidade  $\delta$  da fosforilase-b-cinase, uma calmodulina (ver Figura 12-11). O AMP, que se acumula no músculo em contração vigorosa como resultado da degradação do ATP, se liga à fosforilase e a ativa, acelerando a liberação da glicose-1-fosfato a partir do glicogênio. Quando os níveis de ATP estão adequados, o ATP bloqueia o sítio alostérico ao qual o AMP se liga, causando a inativação da fosforilase.

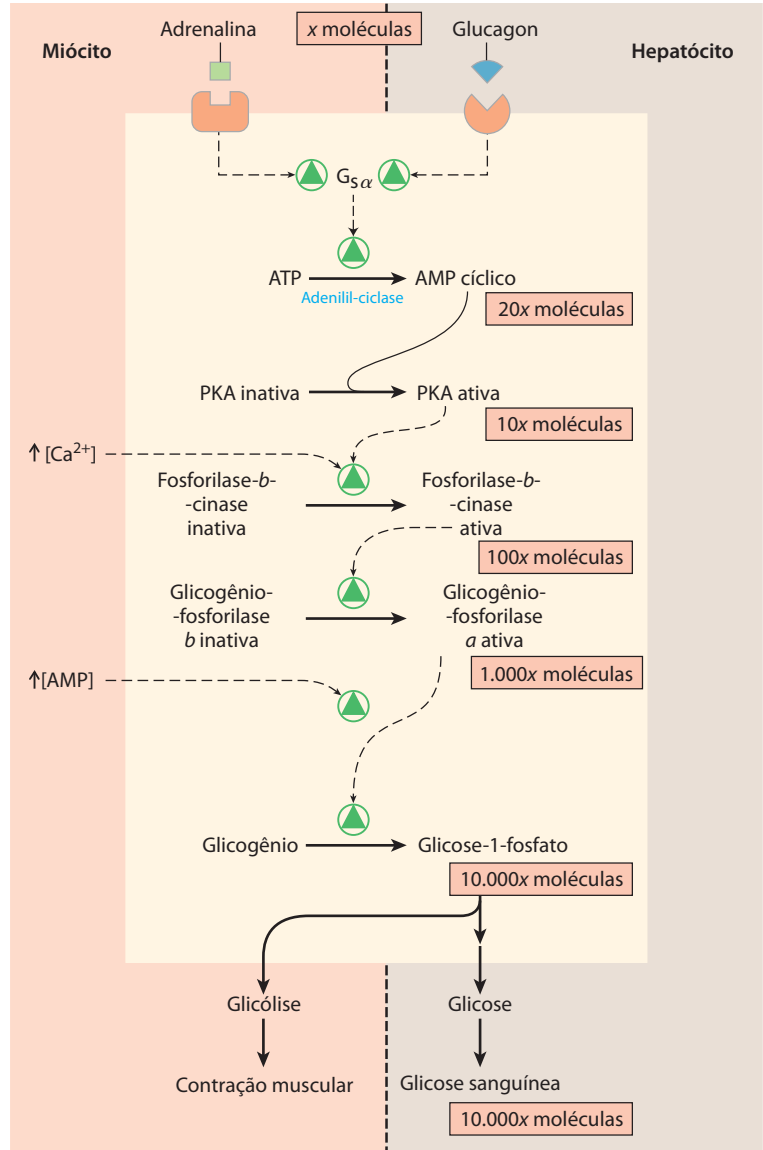
Quando o músculo retorna ao repouso, uma segunda enzima, a **fosforilase-a-fosfatase**, também chamada de **fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1)**, remove os grupos fosforil da fosforilase a, convertendo-a em sua forma menos ativa, a fosforilase b.

À semelhança da enzima do músculo, a glicogênio-fosforilase do fígado é regulada hormonalmente (por fosforilação/desfosforilação) e alostericamente. A forma desfosforilada é totalmente inativa. Quando o nível de glicose sanguínea está muito baixo, o glucagon (agindo por meio do mecanismo de cascata mostrado na Figura 15-37) ativa a fosforilase-b-cinase, que, por sua vez, converte a fosforilase b em sua forma ativa a, iniciando a liberação da glicose para o sangue. Quando o nível retorna ao normal, a glicose entra nos hepatócitos e se liga a um sítio alostérico inibitório na fosforilase a. Essa ligação também produz uma mudança de conformação que expõe os re-



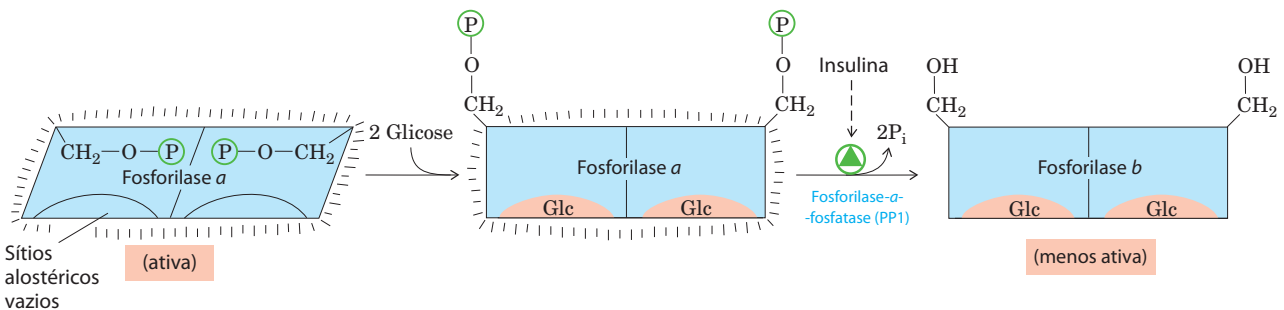
**FIGURA 15-36 Regulação da glicogênio-fosforilase muscular por modificação covalente.** Na forma mais ativa da enzima, fosforilase a, os resíduos de Ser<sup>14</sup>, um de cada subunidade, estão fosforilados. A fosforilase a é convertida em sua forma menos ativa, fosforilase b, por perda enzimática destes grupos fosforil, catalisada pela fosforilase-a-fosfatase (também conhecida como fosfoproteína-fosfatase 1, PP1). A fosforilase b pode ser reconvertida (reativada) em fosforilase a pela ação da fosforilase-b-cinase. (Ver também a Figura 6-42 sobre a regulação da glicogênio-fosforilase.)

**FIGURA 15-37 Mecanismo de cascata da ação da adrenalina e do glucagon.** Tanto a adrenalina nos miócitos (à esquerda) como o glucagon nos hepatócitos (à direita) ligam-se a receptores específicos de superfície e ativam uma proteína de ligação a GTP,  $G_{s\alpha}$  (ver Figura 12-4). Esta proteína quando ativada provoca uma elevação na [cAMP], o que ativa PKA. Isto inicia uma cascata de fosforilações; PKA ativa a fosforilase-b-quinase, que ativa a glicogênio-fosforilase. Tais cascatas causam uma grande amplificação do sinal inicial; os números nos retângulos em cor salmão são provavelmente uma subestimativa do aumento real do número de moléculas em cada estágio da cascata. A degradação do glicogênio decorrente fornece glicose, que no miócito pode suprir o ATP (via glicólise) para a contração muscular e no hepatócito é liberada para o sangue para se opor à glicose sanguínea baixa.



síduos fosforilados de Ser à PP1, que catalisa a desfosforilação da fosforilase, causando sua inativação (Figura 15-38). O sítio alostérico para a glicose permite à glicogênio-fosforilase hepática atuar como seu próprio sensor de glicose e responder adequadamente às alterações na glicose sanguínea.

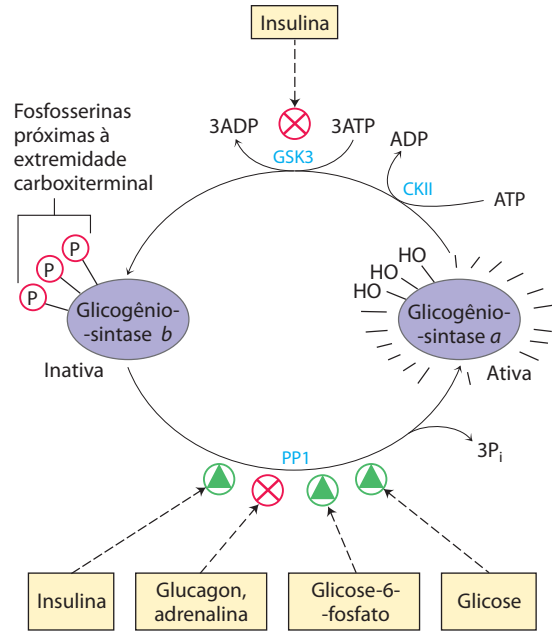
gênio-fosforilase hepática atuar como seu próprio sensor de glicose e responder adequadamente às alterações na glicose sanguínea.



**FIGURA 15-38 A glicogênio-fosforilase do fígado como sensor de glicose.** A ligação da glicose a um sítio alostérico da isoenzima da fosforilase do fígado induz uma mudança conformacional que expõe seus resíduos de Ser fosforilados à ação da fosforilase-fosfatase (PP1). Esta fosfatase converte a

fosforilase *a* em fosforilase *b*, reduzindo claramente a atividade de fosforilase e diminuindo a degradação do glicogênio em resposta à alta glicose sanguínea. A insulina também age indiretamente na estimulação da PP1 e na diminuição da degradação do glicogênio.

**FIGURA 15-39 Efeitos da GSK3 sobre a atividade da glicogênio-sintase.** A forma ativa, glicogênio-sintase *a*, tem três resíduos de Ser próximos à sua extremidade carboxilica que são fosforilados pela glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3). Isto a converte na sua forma inativa (*b*). A ação da GSK3 requer uma fosforilação prévia (preparação) pela caseína-cinase (CKII). A insulina desencadeia a ativação da glicogênio-sintase *b* por bloquear a atividade da GSK3 (consultar via na Figura 12-16) e ativar uma fosfoproteína-fosfatase (PP1 no músculo, outra fosfatase no fígado). No músculo, a adrenalina ativa a PKA, que fosforila a proteína de associação ao glicogênio,  $G_M$  (ver Figura 15-42), em um sítio que causa a dissociação da PP1 do glicogênio. A glicose-6-fosfato favorece a desfosforilação da glicogênio-sintase por se ligar a ela e promover uma conformação que é um bom substrato para a PP1. A glicose também promove a desfosforilação; a ligação da glicose à glicogênio-fosforilase *a* força uma mudança conformacional que favorece a desfosforilação da glicogênio-fosforilase *b*, aliviando, assim, a inibição da PP1 (ver Figura 15-41).

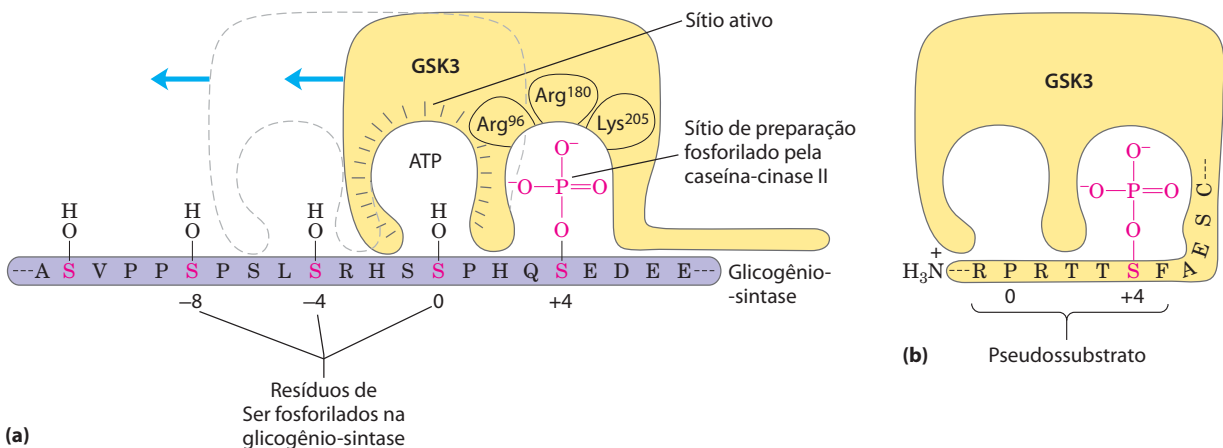


**A glicogênio-sintase também é regulada por fosforilação e desfosforilação**

Tal como a glicogênio-fosforilase, a glicogênio-sintase pode existir nas formas fosforilada e desfosforilada (**Figura 15-39**). Sua forma ativa, **glicogênio-sintase *a***, é não fosforilada. A fosforilação das cadeias laterais hidroxílicas de vários resíduos de Ser de ambas as subunidades converte a glicogênio-sintase *a* em **glicogênio-sintase *b***, que é inativa na ausência da glicose, seu ativador alostérico. A glicogênio-sintase é impressionante por sua capacidade de ser fosforilada em vários resíduos por, pelo menos, 11 diferentes proteínas-cinases. A cinase reguladora mais importante é a **glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3)**, que adiciona grupos fosforil a três resíduos de Ser próximos à extremidade carboxilica da glicogênio-sintase, inativando-a fortemente. A ação da GSK3 é hierárquica; ela só pode fosforilar a glicogênio-sintase depois que outra proteína-cinase, **caseína-**

**-cinase II (CKII)**, tenha fosforilado a glicogênio-sintase em um resíduo próximo, evento chamado de **preparação (Figura 15-40a)**.

No fígado, a conversão da glicogênio-sintase *b* em sua forma ativa é promovida pela PP1, que se encontra ligada à partícula de glicogênio. A PP1 remove os grupos fosforil dos três resíduos fosforilados pela GSK3. A glicose-6-fosfato se liga a um sítio alostérico na glicogênio-sintase *b*, tornando a enzima um substrato melhor para a desfosforilação pela PP1 e causando sua inativação. Por analogia com a glicogênio-fosforilase, que age como sensor de glicose, a



**FIGURA 15-40 Preparação para a fosforilação da glicogênio-sintase pela GSK3.** (a) A glicogênio-sintase-cinase 3 se associa primeiramente com seu substrato (glicogênio-sintase) por interação entre os três resíduos carregados positivamente (Arg<sup>96</sup>, Arg<sup>180</sup>, Lys<sup>205</sup>) e um resíduo de fosfoserina na posição +4 no substrato. (Para orientação, o resíduo de Ser ou Thr a ser fosforilado no substrato está marcado com índice 0. Os resíduos no lado aminoterminal deste resíduo estão numerados como -1, -2, e assim por diante; os resíduos no lado carboxiterminal estão numerados como +1, +2, e assim por diante.) Essa associação alinha o sítio ativo da enzima com o resíduo de Ser na posição 0, que ela fosforila. Isto cria um novo sítio de preparação,

e a enzima se desloca ao longo da proteína para fosforilar a Ser na posição -4, e a seguir a Ser na posição -8. (b) A GSK3 tem um resíduo de Ser próximo de sua extremidade aminoterminal que pode ser fosforilado pela PKA ou pela PKB (ver Figura 15-41). Isto produz uma região de "pseudossubstrato" na GSK3 que se dobra para o sítio de preparação e torna o sítio ativo inacessível a outro substrato proteico, inibindo a GSK3 até que a PP1 remova o grupo fosforil do pseudossubstrato. Outras proteínas que são substrato para a GSK3 também têm um sítio de preparação na posição +4, que deve ser fosforilado por outra proteína-cinase antes que a GSK possa agir sobre elas. (Consulte também as Figuras 6-37 e 12-22b sobre a regulação da glicogênio-sintase.)

glicogênio-sintase pode ser considerada um sensor de glicose-6-fosfato. No músculo, uma fosfatase diferente pode ter o mesmo papel desempenhado pela PP1 no fígado, ativando a glicogênio-sintase por desfosforilação.

### A glicogênio-sintase-cinase 3 controla algumas ações da insulina

Conforme visto no Capítulo 12, a insulina desencadeia mudanças intracelulares pela ativação de uma proteína-cinase (PKB) que, por sua vez, fosforila e inativa a GSK3 (Figura 15-41; ver também Figura 12-16). A fosforilação de um resíduo de Ser próximo da extremidade aminoterminal da GSK3 converte esta região da proteína em um pseudosubstrato, que se dobra para dentro do sítio ao qual normalmente se liga o resíduo de Ser fosforilado (Figura 15-40b). Isso impede a GSK3 de se ligar ao sítio de preparação do substrato verdadeiro, inativando, assim, a enzima e fazendo pender o equilíbrio em favor da desfosforilação da glicogênio-sintase pela PP1. A glicogênio-fosforilase também pode afetar a fosforilação da glicogênio-sintase: a glicogênio-fosforilase ativada inibe PP1 diretamente, impedindo-a de ativar a glicogênio-sintase (Figura 15-39).

Embora tenha sido descoberta pelo seu papel no metabolismo do glicogênio (daí o nome glicogênio-sintase-cinase), a GSK3 tem um papel muito mais abrangente que o de regulação da glicogênio-sintase. Ela é responsável por mediar a sinalização pela insulina e outros fatores de crescimento e nutrientes, atuando na especificação dos destinos celulares durante o desenvolvimento embrionário. Entre os seus alvos estão proteínas do citoesqueleto e proteínas essenciais para a síntese de mRNA e de proteínas. Esses alvos, assim como a glicogênio-sintase, precisam sofrer uma fosforilação preparatória por outra proteína-cinase para que possam ser fosforilados pela GSK3.

### A fosfoproteína-fosfatase 1 é central no metabolismo do glicogênio

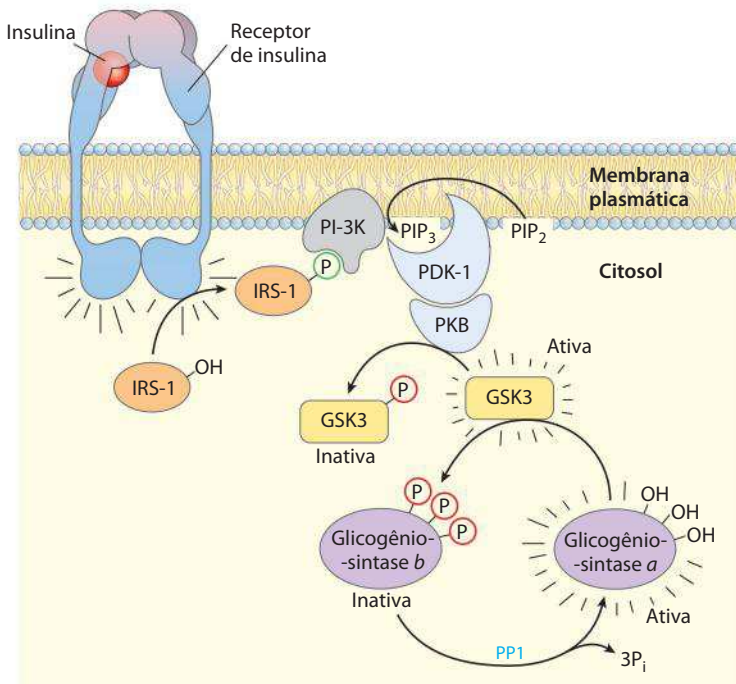
Uma única enzima, PP1, pode remover grupos fosforil das três enzimas que são fosforiladas em resposta ao glucagon (no fígado) e à adrenalina (no fígado e no músculo): fosforilase-cinase, glicogênio-fosforilase e glicogênio-sintase. A insulina estimula a síntese do glicogênio por ativar a PP1 e inativar a GSK3.

A fosfoproteína-fosfatase 1 não existe livre no citosol. Ela está firmemente ligada às suas proteínas-alvo por uma proteína da família das **proteínas de associação ao glicogênio** que se liga ao glicogênio e às três enzimas glicogênio-fosforilase, fosforilase-cinase e glicogênio-sintase (Figura 15-42). A própria PP1 está sujeita à regulação covalente e alostérica: ela é inativada quando fosforilada pela PKA e é ativada alostericamente pela glicose-6-fosfato.

### Sinais alostéricos e hormonais coordenam integralmente o metabolismo dos carboidratos

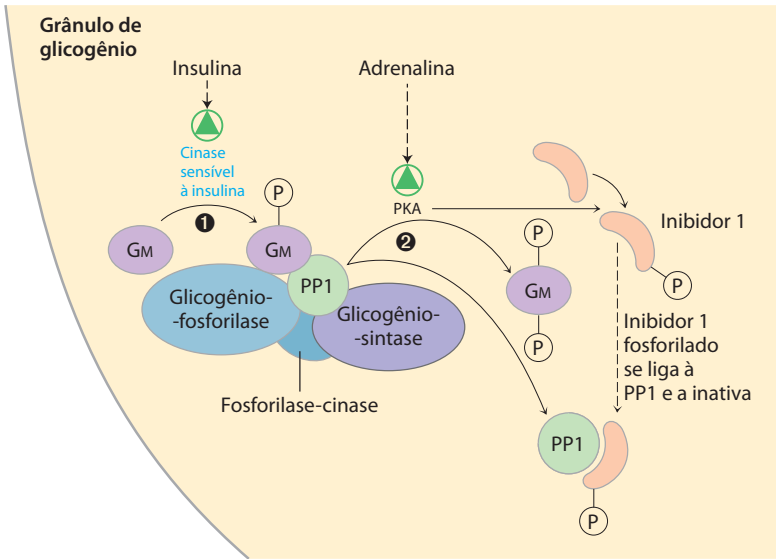
Após abordar os mecanismos que regulam as enzimas individuais, agora é possível considerar as variações totais no metabolismo dos carboidratos que ocorrem no estado bem alimentado, durante o jejum e na resposta de luta ou fuga – sinalizados, respectivamente, por insulina, glucagon e adrenalina. É preciso destacar dois casos nos quais a regulação tem finalidades diferentes: (1) o papel dos hepatócitos no suprimento de glicose para o sangue, e (2) o uso egoísta dos carboidratos como combustível pelos tecidos extra-hepáticos, simbolizados pelo músculo esquelético (miócitos), para manter suas próprias atividades.

Após a ingestão de uma refeição rica em carboidratos, a elevação da glicose sanguínea provoca a liberação



**FIGURA 15-41 O caminho a partir da insulina até a GSK3 e a glicogênio-sintase.** A ligação da insulina ao seu receptor ativa nele uma tirosina-proteína-cinase, que fosforila o substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1). A fosfotirosina nessa proteína é então ligada pela fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3K), que converte, na membrana, o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Uma proteína-cinase (PDK-1), que é ativada quando ligada ao PIP<sub>3</sub>, ativa uma segunda proteína-cinase (PKB), que fosforila a glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3) na sua região de pseudosubstrato, inativando-a pelos mecanismos mostrados na Figura 15-40b. A inativação da GSK3 permite que a fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1) desfosforile e ative a glicogênio-sintase. Dessa forma, a insulina estimula a síntese do glicogênio. (Consulte na Figura 12-16 mais detalhes sobre a ação da insulina.)

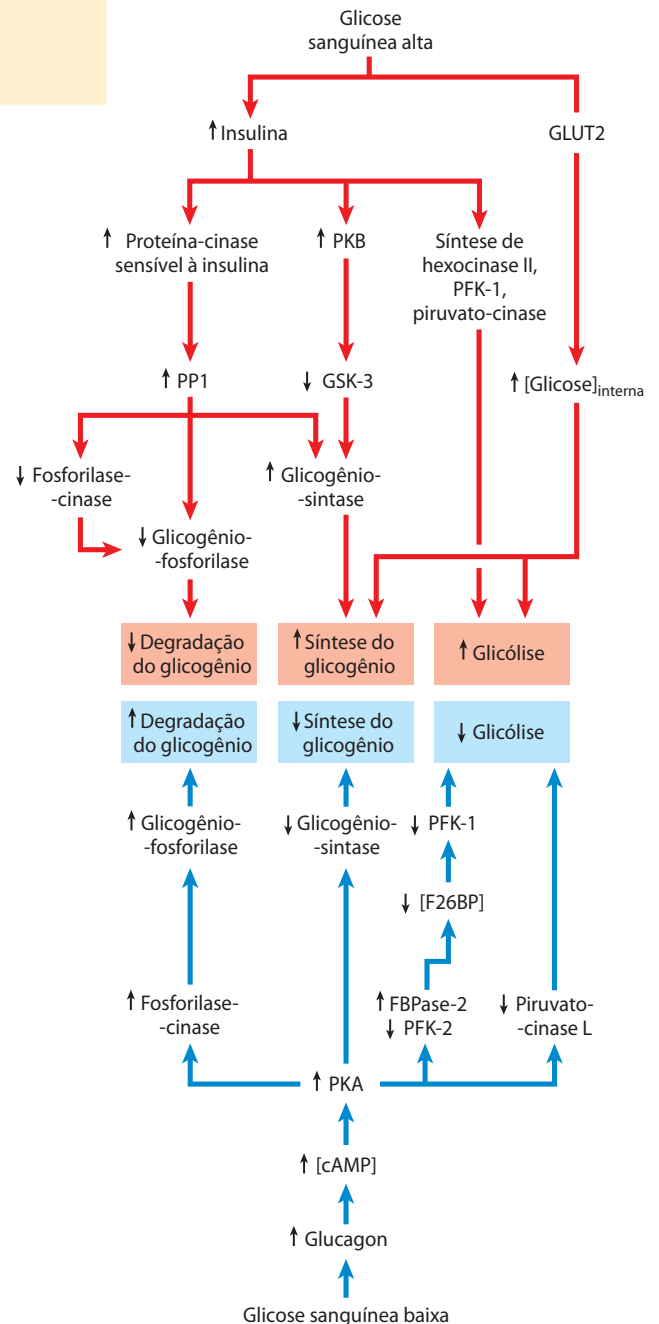




**FIGURA 15-42 Proteína de associação ao glicogênio GM.** A proteína GM de associação ao glicogênio pertence à família de proteínas que ligam outras proteínas (incluindo PP1) às partículas de glicogênio. A GM pode ser fosforilada em dois sítios diferentes em resposta à insulina ou adrenalina. ❶ A fosforilação no sítio 1, estimulada pela insulina, ativa a PP1 que desfosforila a fosforilase-cinase, a glicogênio-fosforilase e a glicogênio-sintase. ❷ A fosforilação no sítio 2, estimulada pela adrenalina, causa a dissociação de PP1 da partícula de glicogênio, impedindo seu acesso à glicogênio-fosforilase e à glicogênio-sintase. A PKA também fosforila uma proteína (inibidor 1) que, quando fosforilada, inibe a PP1. Desta forma, a insulina inibe a degradação do glicogênio e estimula a sua síntese, e a adrenalina (ou o glucagon, no fígado) tem o efeito oposto.

de insulina (Figura 15-43, parte superior). Nos hepatócitos, a insulina tem dois efeitos imediatos: ela inativa a GSK3, agindo por meio da cascata mostrada na Figura 15-41, e ativa uma proteína-fosfatase, talvez a PP1. Essas duas ações ativam totalmente a glicogênio-sintase. A PP1 também inativa a glicogênio-fosforilase *a* e a fosforilase-cinase pela desfosforilação de ambas, interrompendo de forma efetiva a degradação do glicogênio. A glicose entra no hepatócito por meio do transportador de alta capacidade GLUT2, sempre presente na membrana plasmática, e a glicose intracelular elevada leva à dissociação da hexocinase IV (glicocinase) de sua proteína reguladora nuclear (Figura 15-15). A hexocinase IV entra no citosol e fosforila a glicose, estimulando a glicólise, além de fornecer o precursor para a síntese de glicogênio. Sob essas condições, os hepatócitos usam o excesso de glicose do sangue para sintetizar glicogênio, até o limite de 10% do peso total do fígado.

Entre as refeições, ou durante um jejum prolongado, a queda da glicose sanguínea provoca a liberação de glucagon, o qual, agindo por meio da cascata mostrada na Figura 15-37, ativa a PKA. Essa enzima controla todos os efeitos do glucagon (Figura 15-43, parte inferior). Ela fosforila a fosforilase-cinase, ativando-a e levando à ativação da glicogênio-fosforilase. Ela fosforila a glicogênio-sintase, inativando-a e bloqueando a síntese de glicogênio. Ela fosforila a PFK-2/FBPase-2, levando a uma redução na concentração do regulador frutose-2,6-bifosfato, que tem o efeito de inativar a enzima glicolítica PFK-1 e de ativar a enzima gliconeogênica FBPase-1. E ela fosforila e inativa a enzima glicolítica piruvato-cinase. Sob essas condições, o fígado produz glicose-6-fosfato pela degradação do glicogênio e pela gliconeogênese, e para de usar a gli-



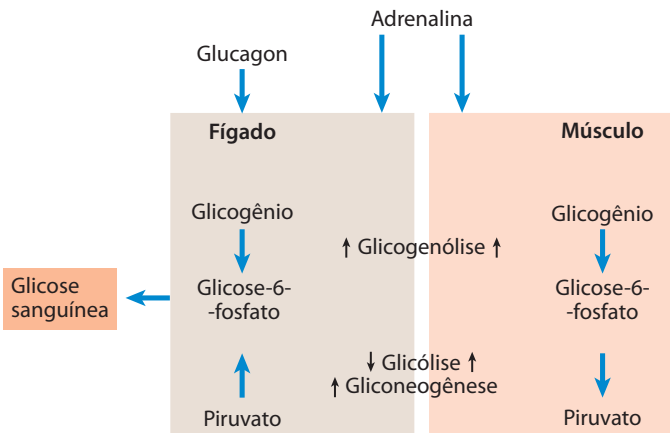
**FIGURA 15-43 Regulação do metabolismo de carboidratos no fígado.** As setas indicam as relações causais entre as mudanças que elas conectam. Por exemplo, uma seta de ↓A para ↑B significa que uma redução de A causa um aumento de B. As setas vermelhas conectam eventos resultantes da glicose sanguínea alta; as setas azuis conectam eventos resultantes da glicose sanguínea baixa.



cose na glicólise ou na síntese de glicogênio, maximizando a quantidade de glicose que pode liberar para o sangue. Essa liberação de glicose é possível somente no fígado e no rim, porque outros tecidos não têm glicose-6-fosfatase (Figura 15-30).

A fisiologia do músculo esquelético difere da do fígado em três aspectos importantes para a nossa discussão sobre regulação metabólica (Figura 15-44): (1) o músculo usa seu glicogênio armazenado somente para suas próprias necessidades; (2) quando passa do repouso para a contração vigorosa, o músculo sofre mudanças muito grandes em sua demanda por ATP, a qual é suprida pela glicólise; (3) o músculo não tem a maquinaria enzimática para a gliconeogênese. A regulação do metabolismo de carboidratos no músculo reflete essas diferenças em relação ao fígado. Em primeiro lugar, os miócitos não têm receptores para o glucagon. Em segundo lugar, a isoenzima muscular da piruvato-cinase não é fosforilada pela PKA, e assim a glicólise não é interrompida quando a [cAMP] estiver alta. Na verdade, o cAMP *umenta* a velocidade da glicólise no músculo, provavelmente por ativar a glicogênio-fosforilase. Quando a adrenalina é liberada no sangue em situações de luta ou fuga, a PKA é ativada pela elevação da [cAMP] e fosforila e ativa a glicogênio-fosforilase-cinase. As consequentes fosforilação e ativação da glicogênio-fosforilase resultam em degradação mais rápida do glicogênio. A adrenalina não é liberada em condições de baixo estresse, mas, com cada estímulo neuronal da contração muscular, a [Ca<sup>2+</sup>] aumenta brevemente e ativa a fosforilase-cinase por meio de sua subunidade de calmodulina.

A elevação da insulina provoca aumento na síntese do glicogênio nos miócitos pela ativação da PP1 e inativação da GSK3. Ao contrário dos hepatócitos, os miócitos têm uma reserva de transportadores GLUT4 sequestrada em vesículas intracelulares. A insulina provoca seu deslocamento



**FIGURA 15-44** Diferenças na regulação do metabolismo de carboidratos no fígado e no músculo. No fígado, glucagon (indicando baixa glicose sanguínea) ou adrenalina (sinalizando a necessidade de lutar ou correr) têm o efeito de maximizar a saída da glicose para a corrente sanguínea. No músculo, a adrenalina aumenta a degradação do glicogênio e a glicólise que, juntas, fornecem combustível para a produção do ATP necessário na contração muscular.

para a membrana plasmática (ver Figura 12-16), onde eles permitem o aumento na captação de glicose. Consequentemente, os miócitos ajudam a baixar a glicose sanguínea em resposta à insulina, porque aumentam a taxa de captação de glicose, a síntese de glicogênio e a glicólise.

### O metabolismo de carboidratos e de lipídeos é integrado por mecanismos hormonais e alostéricos

Apesar de complexa, a regulação do metabolismo de carboidratos está longe da história completa do metabolismo energético. O metabolismo das gorduras e dos ácidos graxos está intimamente ligado ao dos carboidratos. Sinais hormonais como insulina e alterações na dieta ou exercício são igualmente importantes na regulação do metabolismo das gorduras e na integração com o dos carboidratos. O Capítulo 23 volta a abordar essa integração metabólica global, não antes de serem estudadas as vias metabólicas das gorduras e dos aminoácidos (Capítulos 17 e 18). A mensagem que se deseja transmitir aqui é que as vias metabólicas estão sujeitas a controles reguladores complexos extremamente sensíveis a alterações nas condições metabólicas. Esses mecanismos agem no ajuste do fluxo de metabólitos por várias vias metabólicas, conforme a necessidade da célula e do organismo, e o fazem sem causar alterações importantes nas concentrações dos intermediários compartilhados por outras vias.

#### RESUMO 15.5 Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio

- ▶ A glicogênio-fosforilase é ativada em resposta ao glucagon ou à adrenalina, que aumentam a [cAMP] e ativam PKA. A PKA fosforila e ativa a fosforilase-cinase, que converte a glicogênio-fosforilase *b* em sua forma ativa *a*. A fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1) reverte a fosforilação da glicogênio-fosforilase *a*, inativando-a. A glicose se liga à isoenzima hepática da glicogênio-fosforilase *a*, o que favorece sua desfosforilação e inativação.
- ▶ A glicogênio-sintase *a* é inativada por fosforilação catalisada pela GSK3. A insulina bloqueia a GSK3. A PP1, que é ativada pela insulina, reverte a inibição pela desfosforilação da glicogênio-sintase *b*.
- ▶ A insulina aumenta a captação da glicose pelos miócitos e adipócitos por provocar o deslocamento do transportador GLUT4 para a membrana plasmática.
- ▶ A insulina estimula a síntese das hexocinas II e IV, PFK-1, piruvato-cinase, e várias enzimas envolvidas na síntese de lipídeos. A insulina estimula a síntese de glicogênio no músculo e no fígado.
- ▶ No fígado, o glucagon estimula a degradação do glicogênio e a gliconeogênese, enquanto bloqueia a glicólise, poupando, dessa forma, glicose para exportá-la para o cérebro e outros tecidos.
- ▶ No músculo, a insulina estimula a degradação do glicogênio e a glicólise, fornecendo ATP para sustentar a contração.

# Ciclo do Ácido Cítrico

**16.1** Produção de acetil-CoA (acetato ativado) 633

**16.2** Reações do ciclo do ácido cítrico 638

**16.3** Regulação do ciclo do ácido cítrico 653

**16.4** Ciclo do glioxilato 656

Como foi visto no Capítulo 14, algumas células obtêm energia (ATP) pela fermentação, degradando a glicose na ausência de oxigênio. Para a maioria das células eucarióticas e muitas bactérias, que vivem em condições aeróbias e oxidam os combustíveis orgânicos a dióxido de carbono e água, a glicólise é apenas a primeira etapa para a oxidação completa da glicose. Em vez de ser reduzido a lactato, etanol ou algum outro produto da fermentação, o piruvato produzido pela glicólise é posteriormente oxidado a  $H_2O$  e  $CO_2$ . Essa fase aeróbia do catabolismo é chamada de **respiração**. No sentido fisiológico ou macroscópico mais amplo, respiração alude à captação de  $O_2$  e eliminação de  $CO_2$  por organismos multicelulares. Bioquímicos e biólogos celulares, entretanto, utilizam esse termo em um sentido mais estrito para referirem-se ao processo molecular por meio do qual as células consomem  $O_2$  e produzem  $CO_2$  – processo mais precisamente denominado **respiração celular**.

A respiração celular acontece em três estágios principais (**Figura 16-1**). No primeiro, moléculas combustíveis orgânicas – glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos – são oxidadas para produzirem fragmentos de dois carbonos, na forma do grupo acetil da acetil-coenzima A (acetil-CoA). No segundo estágio, os grupos acetil entram no ciclo do ácido cítrico, que os oxida enzimaticamente a  $CO_2$ ; a energia liberada é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH e  $FADH_2$ . No terceiro estágio da respiração, estas coenzimas reduzidas são oxidadas, doando prótons ( $H^+$ ) e elétrons. Os elétrons são transferidos ao  $O_2$  – o aceptor final de elétrons – por meio de uma cadeia de moléculas transportadoras de elétrons, conhecida como cadeia respiratória. No curso da transferência de elétrons, a grande quantidade de energia liberada é conservada na forma de ATP, por um processo chamado de fosforilação oxidativa (Capítulo 19). A respiração é mais complexa do que a glicólise e acredita-se que tenha evoluído muito mais tardiamente,

após o surgimento das cianobactérias. As atividades metabólicas das cianobactérias são responsáveis pelo aumento dos níveis de oxigênio na atmosfera terrestre, um momento decisivo na história evolutiva.

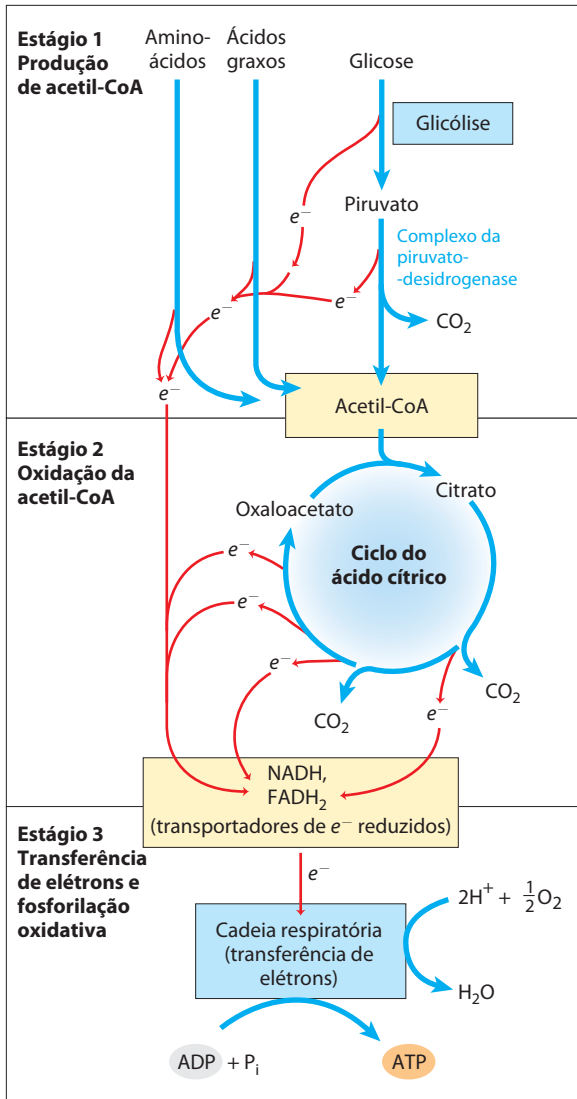
Primeiro será abordada a conversão de piruvato a grupos acetil e, então, a entrada destes grupos no **ciclo do ácido cítrico**, também chamado de **ciclo do ácido tricarbóxico (TCA, de *tricarboxylic acid*)** ou **ciclo de Krebs** (em homenagem ao seu descobridor, Hans Krebs). A seguir, serão examinadas as reações do ciclo e as enzimas que as catalisam. Já que os intermediários do ciclo do ácido cítrico também são desviados como precursores biossintéticos, serão consideradas algumas maneiras pelas quais esses intermediários são repostos. O ciclo do ácido cítrico é um pivô do metabolismo, com vias catabólicas chegando e vias anabólicas partindo, sendo cuidadosamente regulado em coordenação com outras vias. O capítulo termina com uma descrição da via do glioxilato, uma sequência metabólica presente em certos organismos que utiliza algumas das mesmas enzimas e reações utilizadas pelo ciclo do ácido cítrico, causando a síntese líquida de glicose a partir dos triacilgliceróis armazenados.



Hans Krebs, 1900-1981

## 16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado)

Em organismos aeróbios, glicose e outros açúcares, ácidos graxos e a maioria dos aminoácidos são finalmente oxidados a  $CO_2$  e  $H_2O$  pelo ciclo do ácido cítrico e pela cadeia respiratória. Antes de entrarem no ciclo do ácido cítrico, os esqueletos de carbono dos açúcares e ácidos graxos são convertidos ao grupo acetil da acetil-CoA, a forma na qual a maioria dos combustíveis entra no ciclo. Os carbonos de muitos aminoácidos também entram no ciclo dessa maneira, embora alguns aminoácidos sejam convertidos a outros intermediários do ciclo. Aqui, o foco será em como o piruvato, derivado da glicose e de outros açúcares pela glicólise,



**FIGURA 16-1** Catabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos durante os três estágios da respiração celular. Estágio 1: a oxidação de ácidos graxos, glicose e alguns aminoácidos gera acetil-CoA. Estágio 2: a oxidação dos grupos acetil no ciclo do ácido cítrico inclui quatro etapas nas quais os elétrons são removidos. Estágio 3: os elétrons carreados por NADH e  $FADH_2$  convergem para uma cadeia de transportadores de elétrons mitocondrial (ou, em bactérias, ligados à membrana plasmática) – a cadeia respiratória – reduzindo, no final,  $O_2$  a  $H_2O$ . Este fluxo de elétrons impulsiona a produção de ATP.

é oxidado a acetil-CoA e  $CO_2$  pelo **complexo da piruvato-desidrogenase (PDH)**, de *pyruvate dehydrogenase*, um grupo de enzimas – múltiplas cópias de três enzimas – localizado nas mitocôndrias de células eucarióticas e no citosol de bactérias.

O exame cuidadoso desse complexo enzimático é gratificante sob diversos aspectos. O complexo da PDH é um exemplo clássico e muito estudado de um complexo multienzimático no qual uma série de intermediários químicos permanece ligada às moléculas de enzima à medida que o substrato é transformado no produto final. Cinco cofatores, quatro derivados de vitaminas, participam do mecanismo da reação. A regulação desse complexo enzimático também

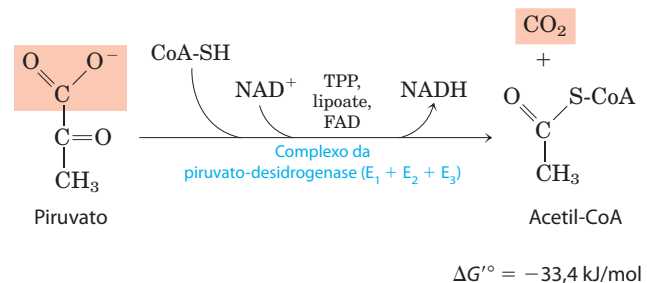
ilustra como uma combinação de modificações covalentes e mecanismos alostéricos resulta em um fluxo precisamente regulado em uma etapa metabólica. Finalmente, o complexo da PDH é o protótipo para dois outros importantes complexos enzimáticos:  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase, do ciclo do ácido cítrico, e  $\alpha$ -cetoácido-desidrogenase de cadeia ramificada, das vias de oxidação de alguns aminoácidos (ver Figura 18-28). A notável similaridade na estrutura de proteínas, na exigência de cofator e nos mecanismos de reação desses três complexos inquestionavelmente reflete uma origem evolutiva comum.

### O piruvato é oxidado a acetil-CoA e $CO_2$

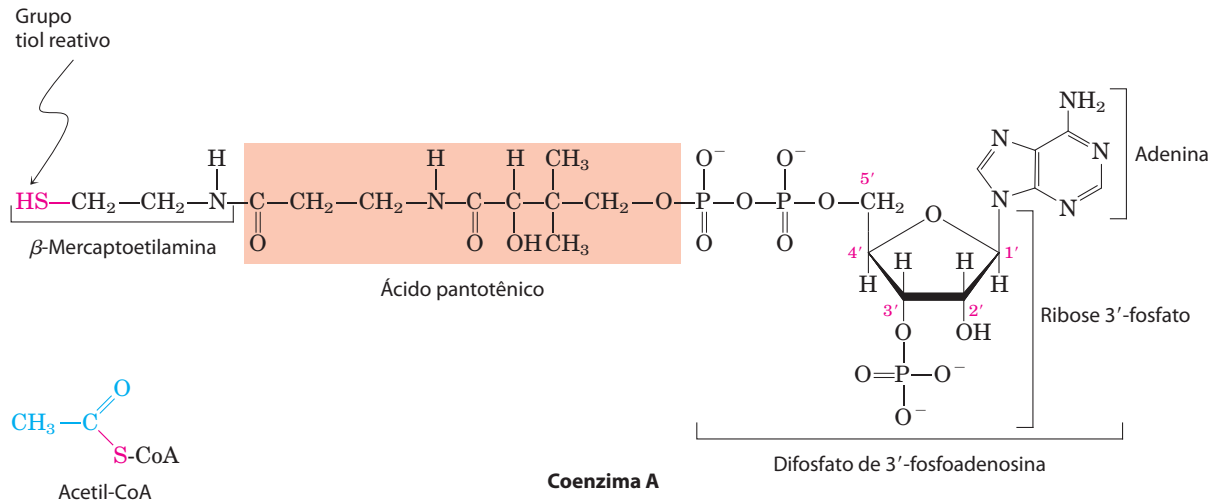
A reação geral catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase é uma **descarboxilação oxidativa**, um processo de oxidação irreversível no qual o grupo carboxil é removido do piruvato na forma de uma molécula de  $CO_2$ , e os dois carbonos remanescentes são convertidos ao grupo acetil da acetil-CoA (Figura 16-2). O NADH formado nessa reação doa um íon hidreto ( $:H^-$ ) para a cadeia respiratória (Figura 16-1), que transferirá os dois elétrons ao oxigênio ou, em microrganismos anaeróbios, a um aceptor de elétrons alternativo, como nitrato ou sulfato. A transferência de elétrons do NADH ao oxigênio gera, ao final, 2,5 moléculas de ATP por par de elétrons. A irreversibilidade da reação do complexo da PDH foi demonstrada por experimentos com marcação isotópica: o complexo não pode religar  $CO_2$  radioativamente marcado à acetil-CoA para formar uma molécula de piruvato com o carboxil marcado.

### O complexo da piruvato-desidrogenase requer cinco coenzimas

A combinação de desidrogenação e descarboxilação do piruvato ao grupo acetil da acetil-CoA (Figura 16-2) requer a ação sequencial de três enzimas diferentes e cinco coenzimas diferentes ou grupos prostéticos – pirofosfato de tiamina (TPP, de *thiamine pyrophosphate*), dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD, de *flavin adenine dinucleotide*), coenzima A (CoA, algumas vezes denominada CoA-SH, para enfatizar a função do grupo  $-SH$ ), dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD, de *nicotinamide adenine dinucleotide*) e lipoato. Quatro vitaminas diferentes essenciais à nutrição humana são componentes vitais desse sistema: tiamina (no TPP), riboflavina (no FAD), niacina (no NAD)



**FIGURA 16-2** Reação geral catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase. As cinco enzimas participantes desta reação e as três enzimas que formam o complexo são discutidas no texto.



**FIGURA 16-3 Coenzima A (CoA).** Um grupo hidroxil do ácido pantotênico está unido a uma molécula de ADP modificada por uma ligação fosfoéster, e seu grupo carboxil está ligado a β-mercaptoetilamina por uma ligação amida. O grupo hidroxil na posição 3' da molécula de ADP tem um grupo

fosfato que não está presente no ADP livre. O grupo —SH da molécula de mercaptoetilamina forma um tioéster com o acetato para formar a acetil-coenzima A (acetil-CoA) (à esquerda, embaixo).

e pantotenato (na CoA). Foram descritas anteriormente as funções de FAD e NAD como transportadores de elétrons (Capítulo 13) e verificou-se que o TPP era a coenzima da piruvato-descarboxilase (ver Figura 14-15).

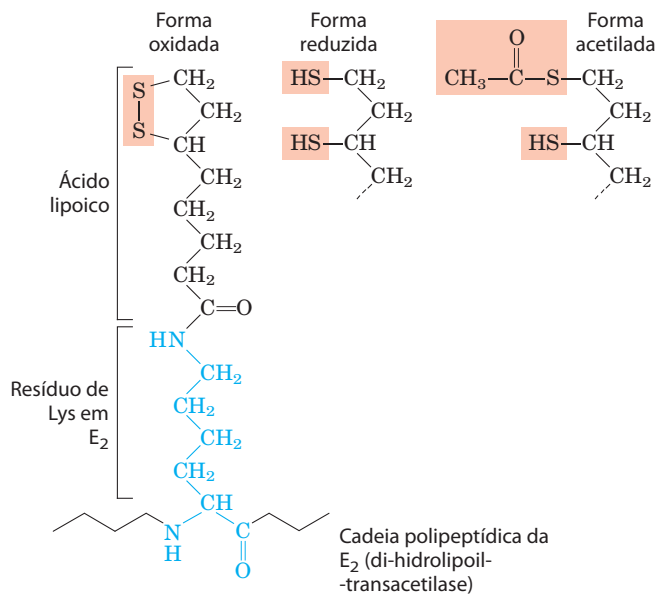
A coenzima A (**Figura 16-3**) tem um grupo tiol reativo (—SH) que é crucial para a função da CoA como transportador de acilas em diferentes reações metabólicas. Grupos acil são covalentemente ligados ao grupo tiol, formando **tioésteres**. Devido às energias de ativação padrão relativamente altas (ver Figuras 13-16, 13-17), os tioésteres têm um alto potencial para a transferência do grupo acil e podem doar estes grupos a diversas moléculasceptoras. O grupo acil unido à coenzima A pode, portanto, ser considerado “ativado” para transferência.

O quinto cofator do complexo da PDH, o **lipoato** (**Figura 16-4**), tem dois grupos tiol que podem ser reversivelmente oxidados por uma ligação dissulfeto (—S—S—), similar àquela entre dois resíduos de Cys em uma proteína. Devido à sua capacidade de participar de reações de oxidação e redução, o lipoato atua como transportador de elétrons (hidrogênio) e como transportador de acilas, como será visto.

### O complexo da piruvato-desidrogenase consiste em três enzimas distintas

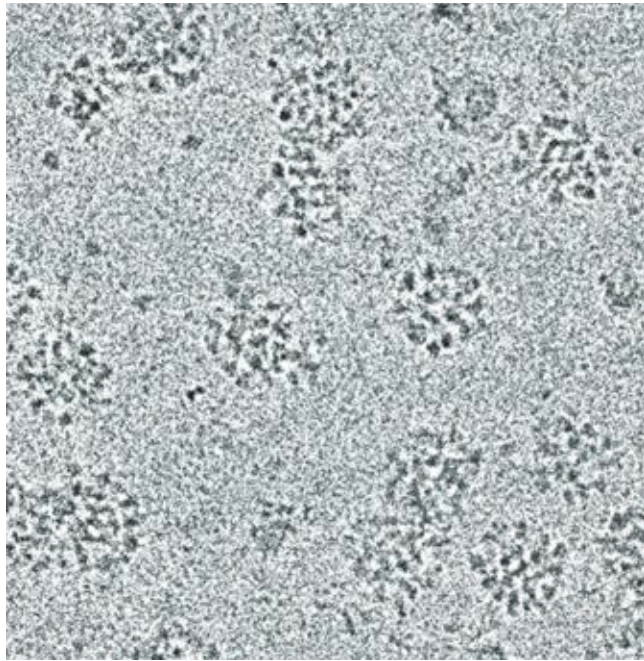
O complexo da PDH contém três enzimas – **piruvato-desidrogenase** (E<sub>1</sub>), **di-hidrolipoil-transacetilase** (E<sub>2</sub>) e **di-hidrolipoil-desidrogenase** (E<sub>3</sub>) – cada uma presente em múltiplas cópias. O número de cópias de cada enzima e, portanto, o tamanho do complexo varia entre espécies. O complexo da PDH isolado de mamíferos apresenta um diâmetro de cerca de 50 nm – mais de cinco vezes o tamanho de um ribossomo inteiro e grande o suficiente para ser visto por microscopia eletrônica (**Figura 16-5a**). Na enzima bovina, 60 cópias idênticas de E<sub>2</sub> formam um dodecaedro pentagonal (o centro) com um diâmetro de aproximadamente 25 nm (**Figura 16-5b**). (O centro da enzima

de *Escherichia coli* contém 24 cópias de E<sub>2</sub>.) E<sub>2</sub> é o ponto de conexão para o grupo prostético lipoato, unido ao grupo ε-amino de um resíduo de Lys por uma ligação amida (**Figura 16-4**). E<sub>2</sub> tem três domínios funcionalmente distintos (**Figura 16-5c**): o *domínio lipoil* na porção aminoterminal, contendo o(s) resíduo(s) de lipoil-Lys; o *domínio de ligação* a E<sub>1</sub> e E<sub>3</sub> na porção central; e o *domínio aciltransferase* na porção central mais interna, o qual contém o sítio ativo da aciltransferase. O complexo da PDH de levedura tem um único domínio lipoil ligado ao lipoato, mas o complexo em mamíferos tem dois e, em *E. coli*, três (**Figura**

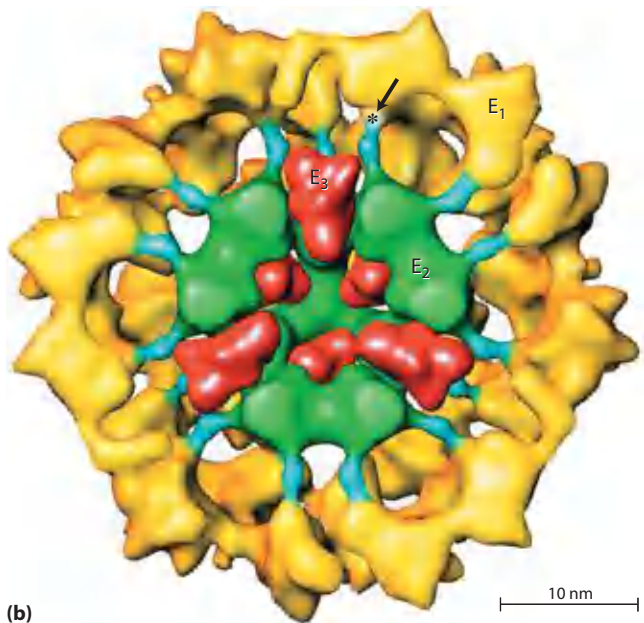


**FIGURA 16-4 Ácido lipoico (lipoato) em ligação amida com um resíduo de Lys.** A porção lipoil-lisina é o grupo prostético da di-hidrolipoil-transacetilase (E<sub>2</sub> do complexo da PDH). O grupo lipoil ocorre na forma oxidada (dissulfeto) e reduzida (ditiol) e atua como transportador de hidrogênio e grupo acetil (ou outro grupo acil).

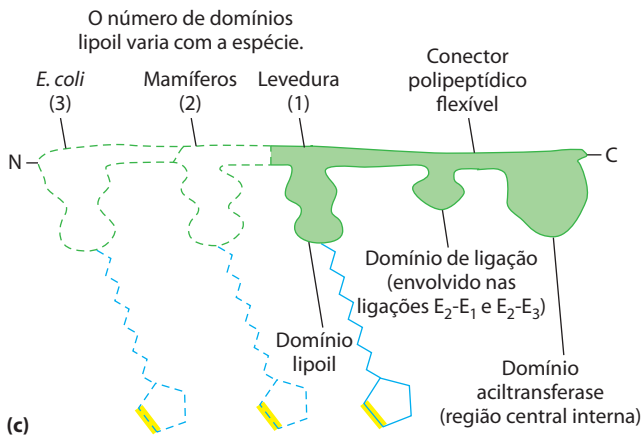




(a) 50 nm



(b) 10 nm



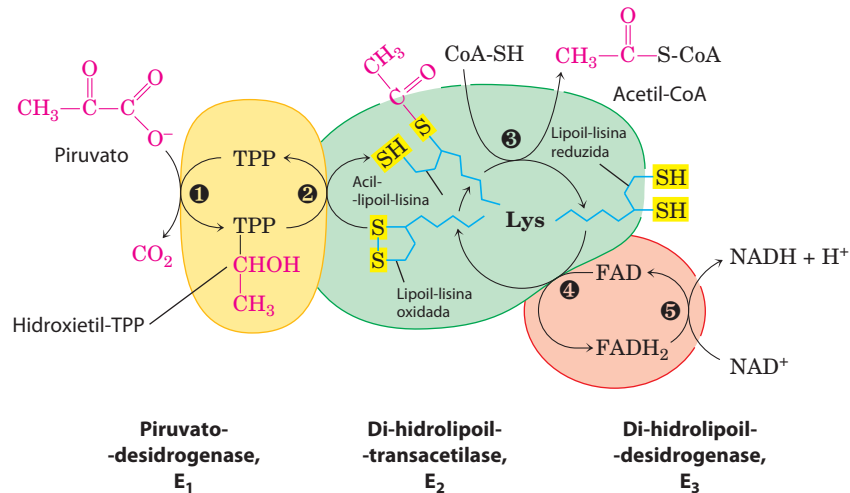
**FIGURA 16-5 Complexo da piruvato-desidrogenase.** (a) Micrografia crioeletrônica de complexos da PDH isolados de rins de bovino. Na microscopia crioeletrônica, as amostras biológicas são visualizadas em temperaturas extremamente baixas; isto evita os potenciais artefatos introduzidos pelos processos usuais de desidratação, fixação e coloração. (b) Imagem tridimensional do complexo da PDH, mostrando a estrutura das subunidades: E<sub>1</sub>, piruvato-desidrogenase; E<sub>2</sub>, di-hidrolipoil-transacetilase; e E<sub>3</sub>, di-hidrolipoil-desidrogenase. Esta imagem foi reconstruída pela análise de um grande número de imagens como aquelas em (a), em combinação com estudos cristalográficos das subunidades individuais. O centro (em verde) consiste em 60 moléculas de E<sub>2</sub>, arranjadas em 20 trímeros que formam um dodecaedro pentagonal. O domínio lipoil de E<sub>2</sub> (em azul) estende-se para fora para conectar-se aos sítios ativos das moléculas de E<sub>1</sub> (em amarelo) arranjadas ao redor do centro de E<sub>2</sub>. Algumas subunidades E<sub>3</sub> (em vermelho) também estão unidas ao centro, no qual um braço flexível de E<sub>2</sub> pode alcançar seus sítios ativos. Um asterisco marca o local onde um grupo lipoil está ligado ao domínio lipoil de E<sub>2</sub>. Para tornar a estrutura mais clara, aproximadamente metade da porção frontal do complexo foi removida. Este modelo foi preparado por Z.H. Zhou e colaboradores (2001); em outro modelo, proposto por J.L.S. Milne e colaboradores (2002), as subunidades de E<sub>3</sub> estão localizadas mais periféricamente (ver Leituras Adicionais). (c) E<sub>2</sub> consiste em três tipos de domínios conectados por polipeptídeos curtos: um domínio catalítico aciltransferase; um domínio de ligação, envolvido na ligação de E<sub>2</sub> a E<sub>1</sub> e E<sub>3</sub>; e um ou mais (dependendo da espécie) domínios lipoil.

16-5c). Os domínios de E<sub>2</sub> são separados por conectores, sequências de 20 a 30 resíduos de aminoácidos, ricos em Ala e Pro e intercalados com resíduos carregados; esses conectores tendem a assumir formas estendidas, mantendo os três domínios afastados.

O sítio ativo de E<sub>1</sub> está ligado ao TPP, e o de E<sub>3</sub> está ligado ao FAD. Duas proteínas de regulação também fazem parte do complexo, uma proteína-cinase e uma fosfoproteína-fosfatase, como discutido a seguir. Essa estrutura E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>-E<sub>3</sub> básica tem sido conservada durante a evolução e é utilizada em diversas reações metabólicas similares, incluindo a oxidação do  $\alpha$ -cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico (descrita a seguir) e a oxidação dos  $\alpha$ -cetoácidos derivados da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, isoleucina e leucina (ver Figura 18-28). Dentro de uma determinada espécie, a E<sub>3</sub> do complexo da PDH é idêntica à E<sub>3</sub> dos outros dois complexos enzimáticos. A ligação do lipoato à extremidade da cadeia lateral de uma Lys em E<sub>2</sub> gera um braço longo e flexível que pode se estender do sítio ativo de E<sub>1</sub> até os sítios ativos de E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>, possivelmente a uma distância de 5 nm ou maior.

### Na canalização do substrato, o intermediário nunca deixa a superfície da enzima

A Figura 16-6 mostra esquematicamente como o complexo da piruvato-desidrogenase conduz as cinco reações consecutivas para a descarboxilação e desidrogenação do piruvato. A etapa 1 é essencialmente idêntica à reação catalisada pela piruvato-decarboxilase (ver Figura 14-15c); o C-1 do piruvato é liberado como CO<sub>2</sub>, e o C-2, que no piruvato está no estado de oxidação de um aldeído, é unido ao TPP como um grupo hidroxietil. A primeira etapa é a mais lenta e, conseqüentemente, limita a velocidade da reação global. Ela também é o ponto no qual o complexo da PDH confirma sua especificidade ao substrato. Na etapa 2, o grupo hidroxietil é oxidado ao nível de um ácido carboxílico (acetato). Os dois elétrons re-



**FIGURA 16-6 Descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA pelo complexo da PDH.** O destino da molécula de piruvato está impresso em vermelho. Na etapa ①, o piruvato reage com o pirofosfato de tiamina (TPP) ligado à piruvato-desidrogenase ( $E_1$ ), sendo descarboxilado ao derivado hidroxietil (ver Figura 14-15). A piruvato-desidrogenase também processa a etapa ②, a transferência de dois elétrons e do grupo acetil a partir do TPP para a forma oxidada do grupo lipoil-lisina do centro do complexo, di-hidrolipoil-transacetilase ( $E_2$ ), formando o acetil-tioéster do grupo lipoil reduzido. A etapa ③ é uma transesterificação na qual o grupo —SH da CoA substi-

tui o grupo —SH de  $E_2$ , produzindo acetil-CoA e a forma completamente reduzida (ditiol) do grupo lipoil. Na etapa ④, a di-hidrolipoil-desidrogenase ( $E_3$ ) promove a transferência de dois átomos de hidrogênio dos grupos lipoil reduzidos de  $E_2$  ao grupo prostético FAD de  $E_3$ , restaurando a forma oxidada do grupo lipoil-lisina de  $E_2$ . Na etapa ⑤, o  $FADH_2$  reduzido de  $E_3$  transfere um íon hidreto ao  $NAD^+$ , formando  $NADH$ . O complexo enzimático está agora pronto para outro ciclo catalítico. (As cores das subunidades correspondem àquelas na Figura 16-5b.)

movidos nessa reação reduzem a —S—S— de um grupo lipoil em  $E_2$  a dois grupos tiol (—SH). O acetil produzido nesta reação de oxidação-redução é primeiramente esterificado a um dos grupos —SH do lipoil e, então, transesterificada a CoA para formar acetil-CoA (etapa ③). Desse modo, a energia da oxidação impede a formação de um tioéster de acetato altamente energético. As reações remanescentes catalisadas pelo complexo da PDH (por  $E_3$ , nas etapas ④ e ⑤) são transferências de elétrons necessárias para a regeneração da forma oxidada (dissulfeto) do grupo lipoil de  $E_2$ , preparando o complexo enzimático para um novo ciclo de oxidação. Os elétrons removidos do grupo hidroxietil derivado do piruvato são passados ao  $NAD^+$  pelo FAD.

Essenciais ao mecanismo do complexo da PDH são os braços flexíveis de lipoil-lisina de  $E_2$ , que recebem os dois elétrons e o grupo acetil de  $E_1$  e os passam a  $E_3$ . Todas essas enzimas e coenzimas estão agrupadas, permitindo que os intermediários reajam rapidamente sem afastarem-se da superfície do complexo enzimático. A sequência de cinco reações mostrada na Figura 16-6 é, assim, um exemplo de **canalização do substrato**. Os intermediários da sequência em múltiplas etapas nunca deixam o complexo, e a concentração local do substrato de  $E_2$  é mantida muito alta. A canalização também evita o “roubo” do grupo acetil ativado por outras enzimas que utilizam esse grupo como substrato. Como será visto, um mecanismo similar de aprisionamento da canalização do substrato entre sítios ativos é utilizado por algumas outras enzimas, com lipoato, biotina ou moléculas similares a CoA servindo como cofatores.



Como pode ser previsto, mutações nos genes das subunidades do complexo da PDH, ou uma deficiência

de tiamina na dieta, podem ter graves consequências. Animais com deficiência de tiamina são incapazes de oxidar o piruvato normalmente. Isso é especialmente importante para o cérebro, que costuma obter toda sua energia por meio da oxidação aeróbia da glicose, em uma via que necessariamente inclui a oxidação do piruvato. O beribéri, doença resultante da deficiência de tiamina, caracteriza-se pela perda da função neural. Essa doença ocorre principalmente em populações cuja dieta consiste basicamente em arroz branco (polido), que carece da casca onde a maioria da tiamina do arroz é encontrada. Pessoas que consomem habitualmente grandes quantidades de álcool também podem desenvolver deficiência de tiamina, pois a maior parte da dieta ingerida consiste nas “calorias vazias”, sem vitaminas, das bebidas destiladas. Um nível de piruvato sanguíneo elevado frequentemente é um indicativo de defeitos na oxidação do piruvato devido a uma destas causas. ■

### RESUMO 16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado)

- ▶ Piruvato, o produto da glicólise, é convertido a acetil-CoA, o material de partida para o ciclo do ácido cítrico, pelo complexo da piruvato-desidrogenase.
- ▶ O complexo da PDH é composto por múltiplas cópias de três enzimas: piruvato-desidrogenase,  $E_1$  (ligada ao cofator TPP); di-hidrolipoil-transacetilase,  $E_2$  (covalentemente ligada ao grupo lipoil); e di-hidrolipoil-desidrogenase,  $E_3$  (com os cofatores FAD e NAD).
- ▶  $E_1$  catalisa a primeira descarboxilação do piruvato, produzindo hidroxietil-TPP, e então a oxidação do grupo hidroxietil a um grupo acetil. Os elétrons dessa oxidação reduzem o dissulfeto do lipoato ligado a  $E_2$ , e o grupo



acetil é transferido em uma ligação tioéster a um grupo —SH do lipoato reduzido.

- ▶  $E_2$  catalisa a transferência do grupo acetil para a coenzima A, formando acetil-CoA.
- ▶  $E_3$  catalisa a regeneração da forma dissulfeto (oxidada) do lipoato; os elétrons passam primeiramente ao FAD, e então ao  $NAD^+$ .
- ▶ Os longos braços de lipoil-lisina movem-se livremente entre o sítio ativo de  $E_1$  e os sítios ativos de  $E_2$  e  $E_3$ , prendendo os intermediários ao complexo enzimático e possibilitando a canalização do substrato.
- ▶ A organização do complexo da PDH é muito similar àquela dos complexos enzimáticos que catalisam a oxidação do  $\alpha$ -cetogluturato e dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada.

## 16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico

Agora serão focalizados os processos por meio dos quais a acetil-CoA é oxidada. Essa transformação química é realizada pelo ciclo do ácido cítrico, a primeira via *cíclica* descoberta (**Figura 16-7**). Para iniciar uma rodada do ciclo, a acetil-CoA doa seu grupo acetil ao composto de quatro carbonos oxaloacetato, formando o composto de seis carbonos citrato. O citrato é, em seguida, transformado a isocitrato, também uma molécula com seis carbonos, o qual é desidrogenado com a perda de  $CO_2$  para produzir o composto de cinco carbonos  $\alpha$ -cetogluturato (também chamado de oxogluturato). O  $\alpha$ -cetogluturato perde uma segunda molécula de  $CO_2$ , originando ao final o composto de quatro carbonos succinato. O succinato é, então, convertido por quatro etapas enzimáticas ao composto de quatro carbonos oxaloacetato – que está, assim, pronto para reagir com outra molécula de acetil-CoA. Em cada rodada do ciclo entra um grupo acetil (dois carbonos) na forma de acetil-CoA, e são removidas duas moléculas de  $CO_2$ ; uma molécula de oxaloacetato é utilizada para a formação do citrato e uma molécula de oxaloacetato é regenerada. Não ocorre nenhuma remoção líquida de oxaloacetato; teoricamente, uma molécula de oxaloacetato pode participar da oxidação de um número infinito de grupos acetil, e, na verdade, o oxaloacetato está presente nas células em concentrações muito baixas. Quatro das oito etapas deste processo são oxidações, nas quais a energia da oxidação é conservada de maneira muito eficiente na forma das coenzimas reduzidas NADH e  $FADH_2$ .

Como mencionado antes, embora o ciclo do ácido cítrico seja fundamental ao metabolismo gerador de energia, sua função não está limitada à conservação energética. Intermediários do ciclo com quatro e cinco carbonos servem como precursores para uma ampla variedade de produtos. Para repor os intermediários removidos com este propósito, as células utilizam reações anapleróticas (de reposição), as quais são descritas a seguir.

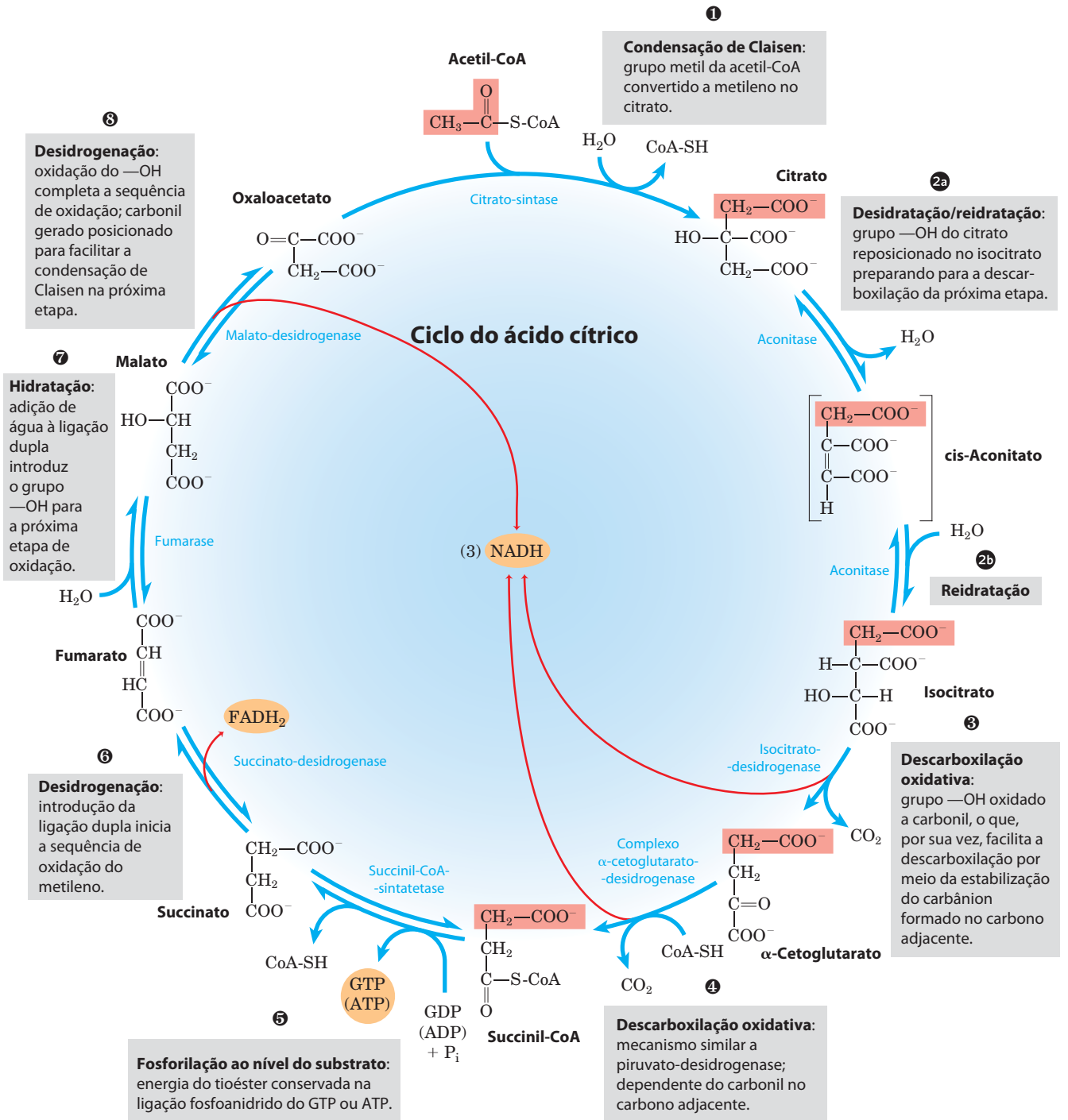
Eugene Kennedy e Albert Lehninger mostraram em 1948 que, em eucariotos, o conjunto inteiro das reações do ciclo do ácido cítrico acontece na mitocôndria. Foi mostrado que as mitocôndrias isoladas não apenas continham

todas as enzimas e coenzimas necessárias para o ciclo do ácido cítrico, mas também todas as enzimas e proteínas necessárias para o último estágio da respiração – a transferência de elétrons e a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa. Como será visto nos capítulos posteriores, a mitocôndria também contém as enzimas para a conversão de ácidos graxos e alguns aminoácidos em acetil-CoA, e para a conversão oxidativa de outros aminoácidos em  $\alpha$ -cetogluturato, succinil-CoA ou oxaloacetato. Dessa maneira, em eucariotos não fotossintéticos, a mitocôndria é o local onde ocorre a maioria das reações oxidativas geradoras de energia e a síntese acoplada de ATP. Em eucariotos fotossintéticos, a mitocôndria é o principal local de produção de ATP no escuro, porém, à luz do dia, os cloroplastos geram a maior parte do ATP desses organismos. Em bactérias, as enzimas do ciclo do ácido cítrico estão no citosol, e a membrana plasmática desempenha uma função semelhante àquela da membrana mitocondrial interna para a síntese de ATP (Capítulo 19).

### A sequência das reações do ciclo do ácido cítrico é quimicamente lógica

A acetil-CoA produzida pela quebra de carboidratos, gorduras e proteínas deve ser completamente oxidada a  $CO_2$  para que o máximo da energia potencial possa ser extraído destes combustíveis. No entanto, a oxidação direta do acetato (ou da acetil-CoA) a  $CO_2$  não é bioquimicamente possível. A descarboxilação deste ácido com dois carbonos produziria  $CO_2$  e metano ( $CH_4$ ). O metano é quimicamente estável, e com exceção de certas bactérias metanotróficas que crescem em nichos ricos em metano, organismos não possuem os cofatores e enzimas necessários para a oxidação do metano. Os grupos metileno ( $-CH_2-$ ), entretanto, são prontamente metabolizados pelos sistemas enzimáticos presentes na maioria dos organismos. Nas sequências de oxidação típicas, estão envolvidos dois grupos metileno adjacentes ( $-CH_2-CH_2-$ ), sendo pelo menos um desses adjacente a um grupo carbonil. Como foi observado no Capítulo 13 (p. 513), os grupos carbonil são particularmente importantes nas transformações químicas das rotas metabólicas. O carbono do grupo carbonil tem uma carga parcial positiva devida à capacidade de atrair elétrons do oxigênio do carbonil, e é, portanto, um centro eletrofílico. Um grupo carbonil pode facilitar a formação de um carbânion em um carbono adjacente pelo deslocamento da carga negativa do carbânion. O ciclo do ácido cítrico mostra um exemplo da oxidação de um grupo metileno quando o succinato é oxidado (etapas 6 a 8 na Figura 16-7), formando um grupo carbonil (no oxaloacetato) que é quimicamente mais reativo do que o metano ou um grupo metileno.

Em resumo, para a acetil-CoA ser oxidada de maneira eficiente, o seu grupo metil deve estar ligado a alguma coisa. A primeira etapa do ciclo do ácido cítrico resolve elegantemente o problema do grupo metil pouco reativo por meio da condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato. O carbonil do oxaloacetato atua como centro eletrofílico, que é atacado pelo carbono do grupo metil da acetil-CoA em uma condensação de Claisen (p. 513) para a forma-



**FIGURA 16-7 Reações do ciclo do ácido cítrico.** Os átomos de carbono sombreados em cor salmão são aqueles derivados do acetato da acetil-CoA durante a primeira rodada do ciclo; estes *não* são os carbonos liberados na forma de CO<sub>2</sub> durante a primeira rodada. Observe que, no succinato e no fumarato, o grupo de dois carbonos derivado do acetato não pode mais ser especificamente indicado; como succinato e fumarato são moléculas simétricas, C-1 e C-2 são indistinguíveis de C-4 e C-3. O número ao lado de cada

etapa de reação corresponde a um tópico numerado nas p. 640-647. As setas em vermelho mostram onde a energia é conservada pela transferência de elétrons ao FAD ou NAD<sup>+</sup>, formando FADH<sub>2</sub> ou NADH + H<sup>+</sup>. As etapas 1, 3 e 4 são essencialmente irreversíveis na célula; todas as outras etapas são reversíveis. O nucleosídeo trifosfatado produzido na etapa 5 pode ser tanto ATP quanto GTP, dependendo da isoenzima de succinil-CoA-sintetase que está catalisando a reação.

ção do citrato (etapa 1 na Figura 16-7). O grupo metil do acetato é convertido a metileno no ácido cítrico. Esse ácido tricarboxílico, então, prontamente passa por uma

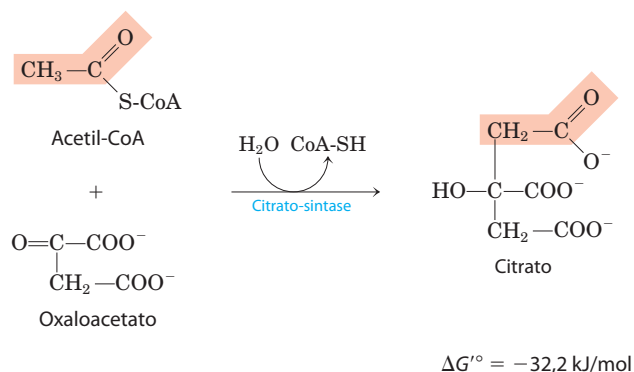
série de oxidações que eliminam dois carbonos na forma de CO<sub>2</sub>. Observe que todas as etapas levando à quebra ou à formação de ligações carbono-carbono (etapas 1, 3 e

④ dependem de grupos carbonil apropriadamente posicionados. Como em todas as rotas metabólicas, existe uma lógica química na sequência das etapas do ciclo do ácido cítrico: cada etapa envolve ou uma oxidação que conserve energia ou ela é um prelúdio necessário para a oxidação, colocando grupos funcionais em posições que facilitem a oxidação ou a descarboxilação oxidativa. À medida que for aprendendo as etapas do ciclo, relembre o raciocínio químico para cada uma; isso tornará o processo mais fácil de entender e lembrar.

### O ciclo do ácido cítrico tem oito etapas

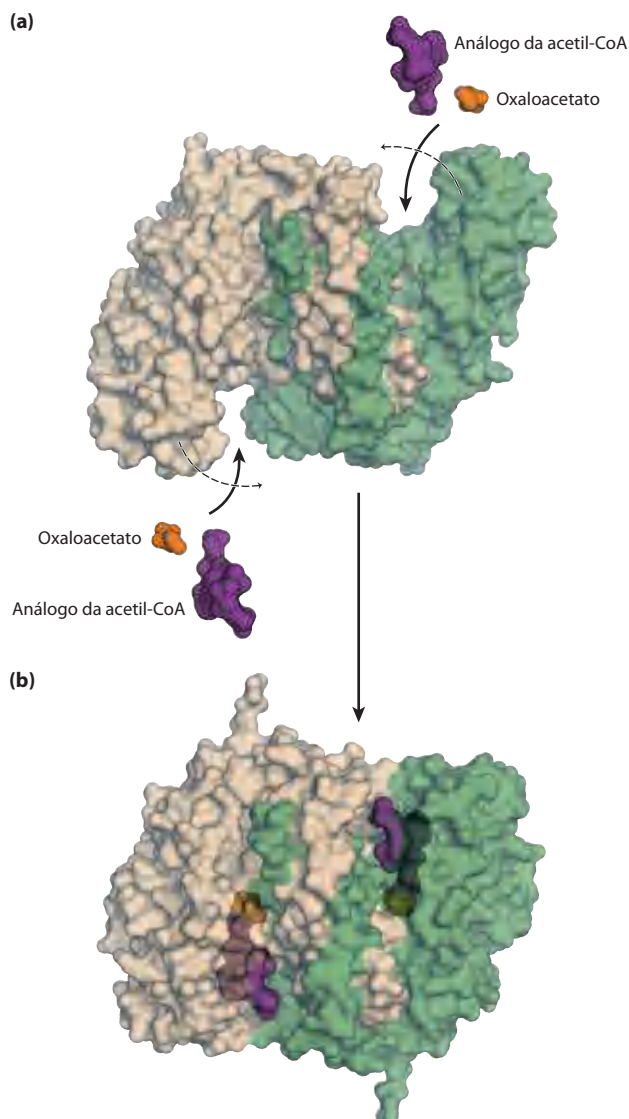
No exame das oito etapas de reação consecutivas do ciclo do ácido cítrico, será dada especial ênfase nas transformações químicas que ocorrem à medida que o citrato formado a partir de acetil-CoA e oxaloacetato é oxidado produzindo  $\text{CO}_2$  e em como a energia dessa oxidação é conservada nas coenzimas reduzidas NADH e  $\text{FADH}_2$ .

❶ **Formação do citrato.** A primeira reação do ciclo é a condensação de acetil-CoA e **oxaloacetato** para a formação do **citrato**, catalisada pela **citrato-sintase**:



Nessa reação, o carbono do metil do grupo acetil é unido ao grupo carbonil (C-2) do oxaloacetato. Citroil-CoA é o intermediário transitoriamente formado no sítio ativo da enzima (ver Figura 16-9). Esse intermediário é rapidamente hidrolisado em CoA livre e citrato, que são liberados do sítio ativo. A hidrólise desse intermediário tioéster de alta energia torna a reação direta altamente exergônica. A grande e negativa variação de energia livre padrão da reação da citrato-sintase é fundamental para o funcionamento do ciclo, pois, como mencionado anteriormente, a concentração de oxaloacetato normalmente é muito baixa. A CoA liberada nessa reação é reciclada para participar da descarboxilação oxidativa de outra molécula de piruvato pelo complexo PDH.

A citrato-sintase mitocondrial foi cristalizada e analisada por difração de raios X na presença e na ausência de substratos e inibidores (Figura 16-8). Cada subunidade dos homodímeros da enzima é um único polipeptídeo com dois domínios, um deles grande e rígido, e o outro menor e mais flexível, com o sítio ativo entre eles. Oxaloacetato, o primeiro substrato a se ligar à enzima, induz uma grande alteração conformacional no domínio flexível, criando um

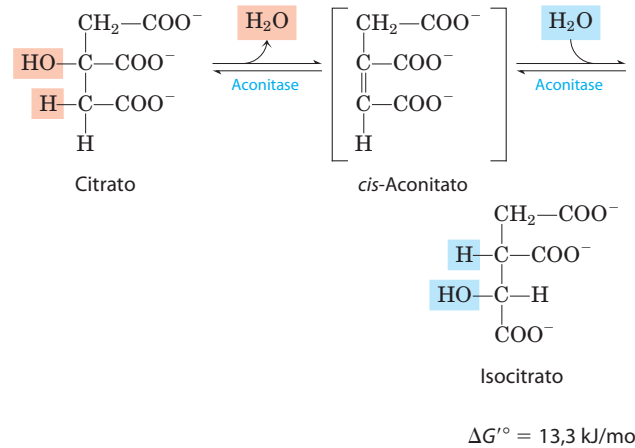


**FIGURA 16-8 Estrutura da citrato-sintase.** O domínio flexível de cada subunidade passa por uma alteração conformacional após a ligação ao oxaloacetato, criando um sítio de ligação para a acetil-CoA. **(a)** Forma aberta da enzima isolada (PDB ID, 5CSC); **(b)** forma fechada ligada ao oxaloacetato e a um análogo estável da acetil-CoA (carboximetil-CoA) (derivada de PDB ID 5CTS). Nestas representações, uma subunidade está colorida em bege e a outra em verde.

sítio de ligação para o segundo substrato, acetil-CoA. Quando o citroil-CoA é formado no sítio ativo da enzima, outra alteração conformacional causa a hidrólise do tioéster, liberando CoA-SH. Esse encaixe induzido da enzima, primeiro ao substrato e posteriormente ao intermediário da reação, diminui a probabilidade de que a clivagem da ligação tioéster da acetil-CoA seja prematura e improdutiva. Os estudos cinéticos da enzima são consistentes com este mecanismo bissubstrato ordenado (ver Figura 6-13). A reação catalisada pela citrato-sintase é fundamentalmente uma condensação de Claisen (p. 513), envolvendo um tioéster e uma cetona (oxaloacetato) (Figura 16-9).

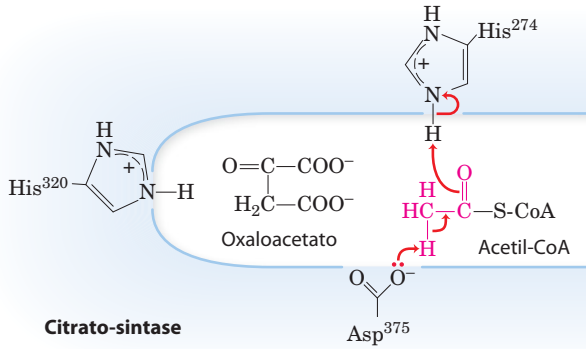
❷ **Formação de isocitrato via *cis*-aconitato.** A enzima **aconitase** (mais formalmente, **aconitato-hidratase**) catalisa a transformação reversível do citrato a **isocitrato**, pela formação intermediária do ácido tricarboxílico ***cis*-aconitato**, o qual normalmente não se dissocia do sítio ativo. A aco-

nitase pode promover a adição reversível de H<sub>2</sub>O à ligação dupla do *cis*-aconitato ligado à enzima de duas maneiras diferentes, uma levando a citrato e a outra a isocitrato:

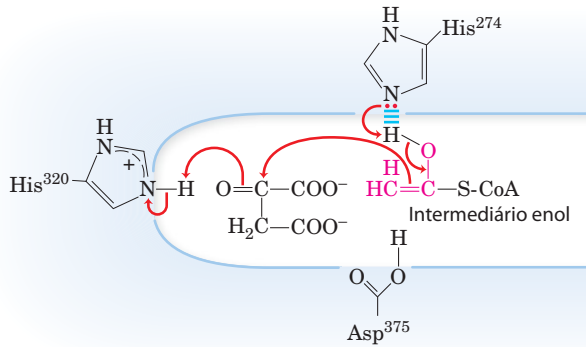


Embora a mistura em equilíbrio a pH 7,4 e 25°C contenha menos de 10% de isocitrato, na célula a reação é deslocada para a direita porque o isocitrato é rapidamente consumido na próxima etapa do ciclo, o que diminui sua concentração no estado estacionário. A aconitase contém um **centro de ferro-enxofre** (Figura 16-10), que atua tanto na ligação do substrato ao sítio ativo quanto na adição ou na remoção catalítica de H<sub>2</sub>O. Em células exauridas de ferro, a aconitase perde o centro de ferro-enxofre e adquire uma nova função na regulação da homeostase do ferro. A aconitase é uma de muitas enzimas caracterizadas por realizar mais de uma função (enzimas *moonlighting*) (Quadro 16-1).

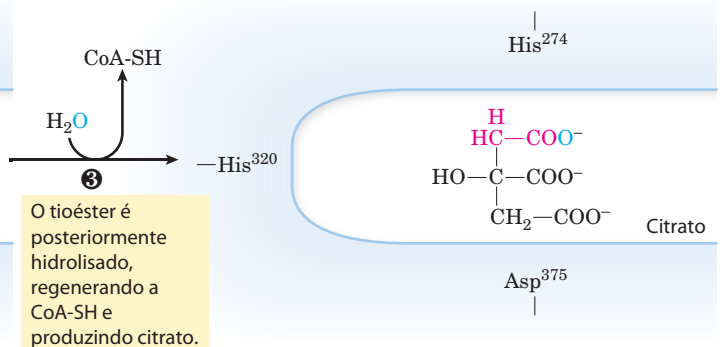
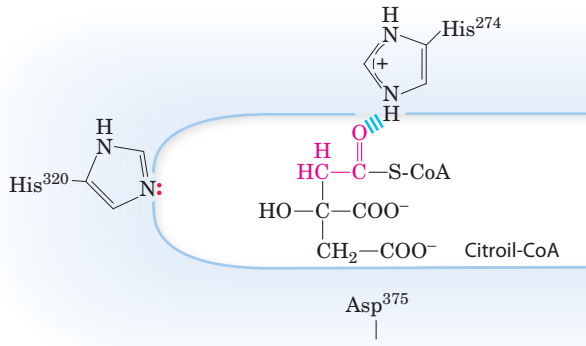
❸ **Oxidação do isocitrato a  $\alpha$ -cetogluturato e CO<sub>2</sub>.** Na próxima etapa, a **isocitrato-desidrogenase** catalisa a descarboxilação oxidativa do citrato para formar  **$\alpha$ -cetogluturato** (Figura 16-11). O Mn<sup>2+</sup> presente no sítio ativo interage



A ligação tioéster na acetil-CoA ativa os hidrogênios do metil. O Asp<sup>375</sup> remove um próton do grupo metil, formando um intermediário enolato. O intermediário é estabilizado por ligações de hidrogênio e/ou protonação pela His<sup>274</sup> (a protonação completa está mostrada).



O enol(ato) rearranja-se para atacar o carbono do carbonil do oxaloacetato, com a His<sup>274</sup> posicionada para recuperar o próton que ela previamente cedeu. A His<sup>320</sup> atua como ácido. A condensação resultante produz citroil-CoA.



**MECANISMO-FIGURA 16-9 Citrato-sintase.** Na reação da citrato-sintase em mamíferos, o oxaloacetato liga-se primeiro, em uma sequência de reação estritamente ordenada. Esta ligação inicia uma alteração na conformação que abre o sítio de ligação para a acetil-CoA. O oxaloacetato está especificamente orientado no sítio ativo da citrato-sintase pela interação de seus dois carboxilatos com dois resíduos positivamente carregados de Arg (não mostrados aqui). Mecanismo da citrato-sintase



**QUADRO 16-1 Enzimas com mais de uma função**

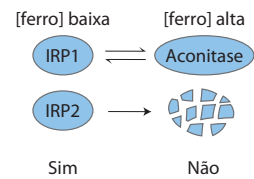
A máxima “um gene-uma enzima”, formulada por George Beadle e Edward Tatum em 1940 (ver Capítulo 24), seguiu incontestada durante grande parte do século XX, assim como ocorreu com a hipótese associada de que cada proteína possui apenas uma função. Recentemente, porém, muitas exceções admiráveis a essa simples fórmula foram descobertas – situações nas quais uma única proteína codificada por um único gene é claramente **“moonlighting”**, cumprindo mais de uma função dentro da célula. A aconitase é uma dessas proteínas: ela atua tanto como enzima quanto como regulador da síntese proteica.

As células eucarióticas têm duas isoenzimas da aconitase. A isoenzima mitocondrial converte citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico. A isoenzima citosólica possui duas funções. Ela catalisa a conversão de citrato a isocitrato, fornecendo o substrato para uma isocitrato-desidrogenase citosólica que produz NADPH com poder redutor para a síntese de ácidos graxos e outros processos anabólicos no citosol. Também tem uma função na homeostase celular do ferro.

Todas as células devem obter o ferro para a atividade das muitas proteínas que o requerem como cofator. Em humanos, a deficiência grave de ferro resulta em anemia, em suprimento insuficiente de eritrócitos e em uma redução da capacidade transportadora de oxigênio que podem ser fatais. O excesso de ferro também é prejudicial: ele se deposita e danifica o fígado na hemocromatose e em outras doenças. O ferro ingerido na dieta é transportado na corrente sanguínea pela proteína **transferrina** e entra nas células por meio da endocitose mediada pelo **receptor de transferrina**. Uma vez dentro da célula, o ferro é utilizado na síntese de hemes, citocromos, proteínas Fe-S e outras proteínas dependentes de Fe, e o excesso de fer-

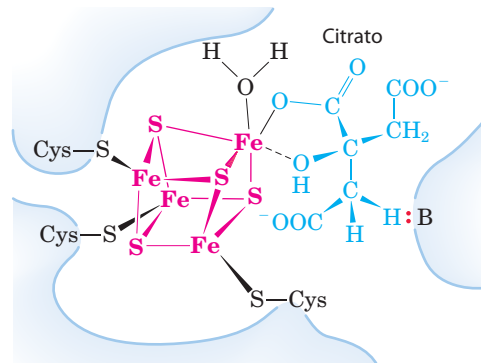
ro é armazenado em ligação com a proteína **ferritina**. Os níveis de transferrina, receptor de transferrina, e ferritina são, portanto, cruciais para a homeostase celular de ferro. A síntese dessas três proteínas é regulada em resposta à disponibilidade de ferro – e a aconitase, em uma de suas funções, desempenha uma função-chave na regulação.

A aconitase tem um agrupamento Fe-S essencial no sítio ativo (ver Figura 16-10). Quando uma célula é exaurida de ferro, esse agrupamento Fe-S é desmontado e a enzima perde sua atividade como aconitase. Entretanto, a apoaconitase, carecendo do agrupamento Fe-S) assim formada adquire agora sua segunda atividade – a capacidade de ligar-se a sequências específicas nos mRNA do receptor de transferrina e da ferritina, regulando dessa maneira a síntese proteica ao nível da tradução. Duas **proteínas reguladoras de ferro, IRP1 e IRP2** (IRP de *iron regulation protein*), foram descobertas independentemente como reguladoras do metabolismo do ferro. Como provado posteriormente, IRP1 é idêntica à apoaconitase citosólica, e IRP2 é muito semelhante a IRP1 em estrutura e função, porém, ao contrário de IRP1, IRP2 não pode ser convertida à aconitase enzimaticamente ativa. Ambas IRP1 e IRP2 se ligam a regiões nos mRNA que codificam a ferritina e o receptor de transferrina, com consequências sobre a mobilização e a captação de ferro. Essas sequências no mRNA fazem parte de estruturas em grampo (p. 292) chamadas de **elementos de resposta a ferro (IRE, de iron response elements)**, localizadas nas extre-



A IRP está ligada ao elemento de resposta a ferro (IRE)?		Sim	Não
<p>mRNA da ferritina                      5' IRE AAA(A)<sub>n</sub> 3'</p>	Tradução do mRNA da ferritina Síntese de ferritina	Reprimida Diminuída	Ativada Aumentada
<p>mRNA do receptor de transferrina (TfR)                      5' IREs AAA(A)<sub>n</sub> 3'</p>	Estabilidade do mRNA do TfR Síntese de TfR	Aumentada Aumentada	Diminuída Diminuída

**FIGURA Q-1** O efeito de IRP1 e IRP2 sobre os mRNA da ferritina e do receptor de transferrina.



**FIGURA 16-10 Centro de ferro-enxofre da aconitase.** O centro de ferro-enxofre está em vermelho, e a molécula de citrato está em azul. Três resíduos de Cys da enzima ligam três átomos de ferro; o quarto ferro está ligado a um dos grupos carboxil do citrato e também interage não covalentemente com um grupo hidroxil do citrato (ligação descontínua). Um resíduo básico (:B) na enzima auxilia no posicionamento do citrato no sítio ativo. O centro de ferro-enxofre atua na ligação do substrato e na catálise. As propriedades gerais das proteínas ferro-enxofre estão discutidas no Capítulo 19 (ver Figura 19-5).



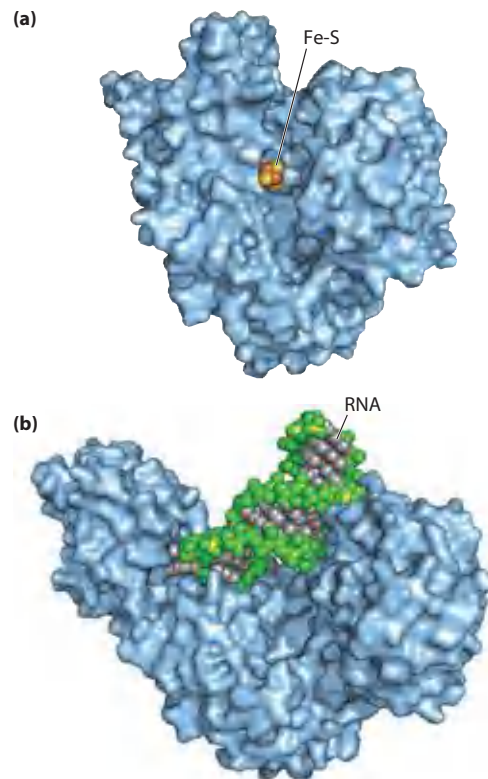
midades 3' e 5' dos mRNA (Figura Q-1). Quando ligadas à sequência IRE da região 5' não traduzida do mRNA da ferritina, as IRP bloqueiam a síntese de ferritina; quando ligadas às sequências IRE da região 3' não traduzida do mRNA do receptor de transferrina, as IRP estabilizam o mRNA, impedindo sua degradação e possibilitando a síntese de mais cópias da proteína receptora por molécula de mRNA. Assim, em células com deficiência de ferro, a captação de ferro torna-se mais eficiente e o armazenamento de ferro (ligado à ferritina) é reduzido. Quando a concentração celular de ferro retorna aos níveis normais, IRP1 é convertida a aconitase, e IRP2 é degradada por proteólise, encerrando a resposta aos baixos níveis de ferro.

A aconitase enzimaticamente ativa e a apoaconitase com atividade reguladora (na segunda jornada da proteína) apresentam estruturas diferentes. Como aconitase ativa, a proteína tem dois lóbulos que se fecham ao redor do agrupamento Fe-S; como IRP1, os dois lóbulos se abrem, expondo o sítio de ligação ao mRNA (Figura Q-2).

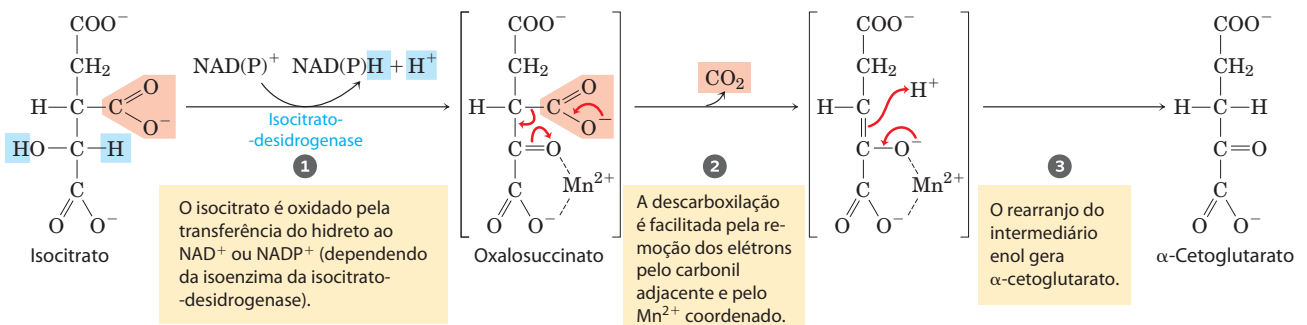
A aconitase é apenas uma de uma lista crescente de enzimas conhecidas (ou presumidas) por realizarem uma segunda função. Muitas das enzimas glicolíticas estão incluídas nesse grupo. A piruvato-cinase atua no núcleo para regular a transcrição de genes responsivos ao hormônio da tireoide. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase atua tanto como uracila-DNA-glicosilase, afetando o reparo de DNA danificado, quanto como regulador da transcrição da histona H2B. O cristalino dos olhos dos vertebrados apresenta algumas enzimas glicolíticas multifuncionais, incluindo a fosfoglicerato-cinase, triose-fosfato-isomerase e lactato-desidrogenase.

Até recentemente, a descoberta de que uma proteína tem mais de uma função era principalmente uma questão de sorte: dois grupos de pesquisadores estudando duas questões não relacionadas descobriam que “suas” proteínas tinham propriedades similares, as comparavam cuidadosamente e descobriam que elas eram idênticas. Com o crescimento das bases de dados com sequências de DNA e de proteínas anotadas, os pesquisadores agora podem investigar deliberadamente a multifuncionalidade das proteínas, procurando nas bases de dados por qualquer outra proteína com a mesma sequência que a proteína sob estudo, porém com função diferente. Isso

também significa que uma proteína anotada nas bases de dados como exercendo uma determinada função não necessariamente tenha *apenas* aquela função. O conhecimento de proteínas com mais de uma função também pode explicar alguns resultados intrigantes: experimentos nos quais uma proteína com uma função conhecida é inativada por uma mutação, mas os organismos mutantes resultantes apresentam um fenótipo sem uma relação óbvia com aquela função.

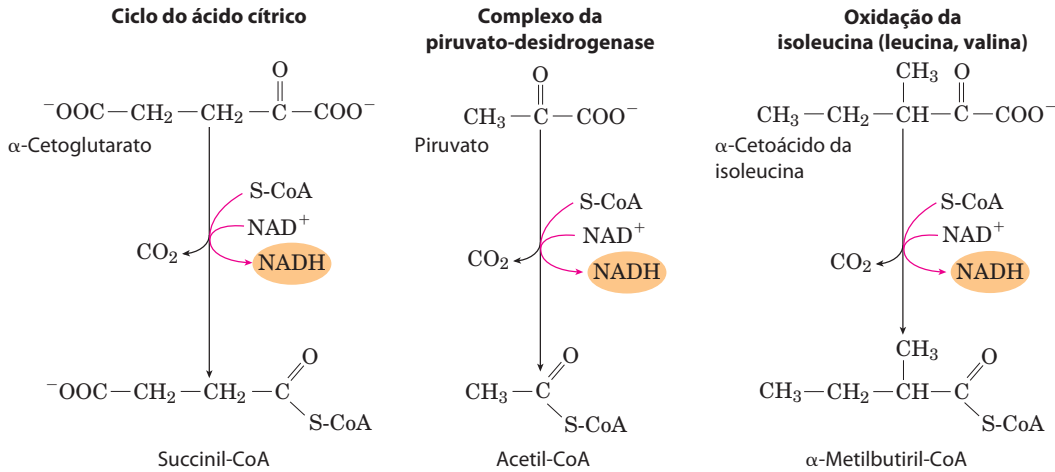


**FIGURA Q-2** As duas formas da aconitase/IRP1 citosólica com duas funções distintas. **(a)** Na aconitase, os dois lóbulos principais estão fechados e o agrupamento Fe-S está completamente coberto; a proteína está representada de forma transparente para exibir o agrupamento Fe-S (PDB ID 2B3Y). **(b)** Na IRP1, os lóbulos se abrem, expondo um sítio de ligação à estrutura em grampo do mRNA do substrato (PDB ID 2IPY).



**MECANISMO-FIGURA 16-11 Isocitrato-desidrogenase.** Nesta reação, o substrato, isocitrato, perde um carbono por descarboxilação oxidativa. Ver Fi-

gura 14-14 para mais informações sobre reações de transferência de hidretos envolvendo NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup>.



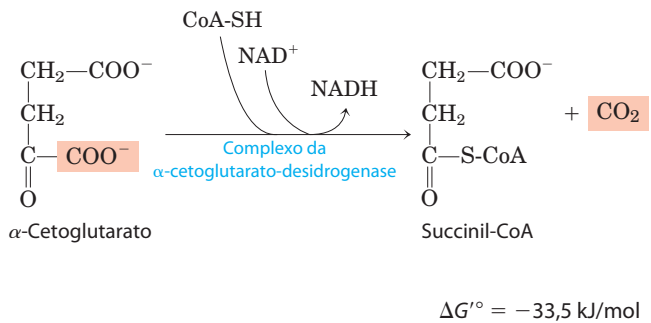
**FIGURA 16-12 Um mecanismo conservado para a descarboxilação oxidativa.** As rotas mostradas empregam os mesmos cinco cofatores (pirofosfato de tiamina, coenzima A, lipoato, FAD e NAD<sup>+</sup>), complexos multienzimáticos muito parecidos, e o mesmo mecanismo enzimático para efetuar a descarboxilação do piruvato (pelo complexo da piruvato-desidrogenase), do

α-cetoglutarato (no ciclo do ácido cítrico), e do esqueleto de carbono dos três aminoácidos ramificados, isoleucina (mostrado aqui), leucina e valina. Uma quarta reação, catalisada pela glicina-descarboxilase, envolve um mecanismo muito semelhante (ver Figura 20-22).

com o grupo carbonil do oxalosuccinato intermediário, que é formado transitoriamente, mas só deixa o sítio ativo quando a descarboxilação o converte em α-cetoglutarato. O Mn<sup>2+</sup> também estabiliza o enol formado transitoriamente por descarboxilação.

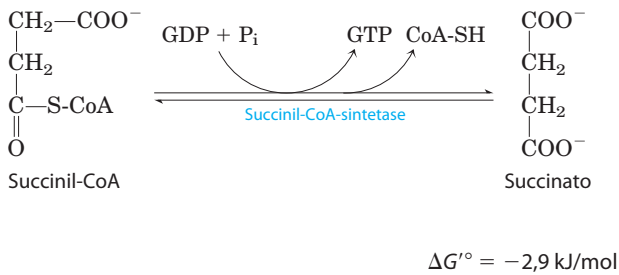
Em todas as células, existem duas formas diferentes de isocitrato-desidrogenase, uma que exige NAD<sup>+</sup> como aceptor de elétrons e outra que exige NADP<sup>+</sup>. As reações gerais são, em outros aspectos, idênticas. Em células eucarióticas, a enzima dependente de NAD encontra-se na matriz mitocondrial e participa do ciclo do ácido cítrico. A principal função da enzima dependente de NADP, encontrada na matriz mitocondrial e no citosol, possivelmente seja a produção de NADPH, essencial para as reações redutoras anabólicas.

**4 Oxidação do α-cetoglutarato a succinil-CoA e CO<sub>2</sub>.** A etapa seguinte é outra descarboxilação oxidativa, na qual o α-cetoglutarato é convertido a **succinil-CoA** e CO<sub>2</sub> pela ação do **complexo da α-cetoglutarato-desidrogenase**; NAD<sup>+</sup> é o aceptor de elétrons e CoA é o transportador do grupo succinil. A energia da oxidação do α-cetoglutarato é conservada pela formação da ligação tioéster da succinil-CoA:



Essa reação é essencialmente idêntica à reação da piruvato-desidrogenase discutida anteriormente, e à sequência de reações responsável pela degradação dos aminoácidos com cadeia ramificada (Figura 16-12). O complexo α-cetoglutarato-desidrogenase é bastante semelhante ao complexo da PDH em estrutura e função. O complexo α-cetoglutarato-desidrogenase incorpora três enzimas homólogas às E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub> do complexo da PDH, e também contém TPP e lipoato ligado à enzima, FAD, NAD e coenzima A. Ambos os complexos são certamente derivados de um ancestral evolutivo comum. Embora os componentes E<sub>1</sub> dos dois complexos sejam estruturalmente similares, suas sequências de aminoácidos diferem e, naturalmente, eles apresentam especificidades de ligação diferentes: E<sub>1</sub> do complexo da PDH liga-se ao piruvato, e E<sub>1</sub> do complexo da α-cetoglutarato-desidrogenase liga-se ao α-cetoglutarato. Os componentes E<sub>2</sub> dos dois complexos também são muito similares, ambos contendo lipoil ligado covalentemente. As subunidades E<sub>3</sub> são idênticas nos dois complexos enzimáticos. O complexo que degrada α-cetoácidos com cadeias ramificadas (ver Figura 18-28) catalisa a mesma sequência de reações utilizando os mesmos cinco cofatores. Esse é um exemplo claro de **evolução divergente**, na qual os genes que codificam para uma enzima com uma especificidade de substrato originam, durante a evolução, enzimas proximamente relacionadas com especificidades de substrato diferentes, mas com o mesmo mecanismo enzimático.

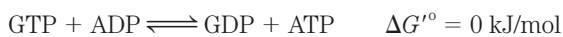
**5 Conversão de succinil-CoA a succinato.** A succinil-CoA, como a acetil-CoA, tem uma ligação tioéster com uma energia livre padrão de hidrólise grande e negativa (ΔG'<sup>o</sup> ≈ -36 kJ/mol). Na próxima etapa do ciclo do ácido cítrico, a energia liberada pelo rompimento dessa ligação é utilizada para impelir a síntese de uma ligação fosfoanidrido no GTP ou ATP, com um ΔG'<sup>o</sup> de apenas -2,9 kJ/mol. O **succinato** é formado neste processo:



A enzima que catalisa essa reação reversível é chamada de **succinil-CoA-sintetase** ou **succinato-tiocinase**; ambos os nomes indicam a participação de um nucleosídeo trifosfatado na reação (Quadro 16-2).

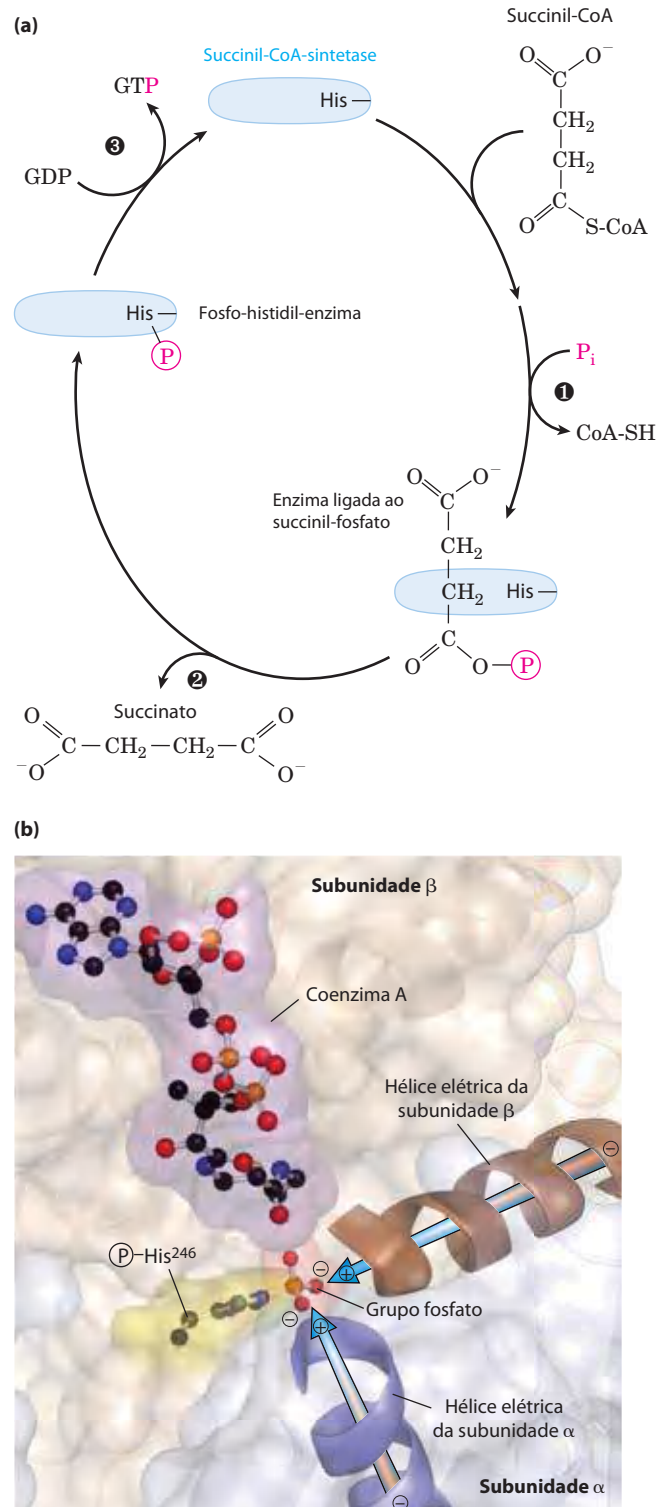
Essa reação que poupa energia envolve uma etapa intermediária, na qual a própria molécula da enzima é fosforilada em um resíduo de His no sítio ativo (**Figura 16-13a**). Esse grupo fosfato, que tem alto potencial de transferência de grupo, é transferido ao ADP (ou GDP) para a formação de ATP (ou GTP). As células animais têm duas isoenzimas da succinil-CoA-sintetase, uma específica para ADP e outra para GDP. A enzima contém duas subunidades,  $\alpha$  ( $M_r$  32.000), que tem o resíduo de  $\text{P-His}$  ( $\text{His}^{246}$ ) e o sítio de ligação para CoA, e  $\beta$  ( $M_r$  42.000), que confere a especificidade por ADP ou GDP. O sítio ativo se situa na interface entre as subunidades. A estrutura do cristal da succinil-CoA-sintetase revela duas “hélices elétricas” (uma em cada subunidade), orientadas de maneira que seus dipolos elétricos posicionem as cargas parciais positivas próximas ao resíduo  $\text{His-P}$  carregado negativamente (Figura 16-13b), estabilizando o intermediário fosfoenzima. (Relembre a função similar das hélices bipolares na estabilização dos íons  $\text{K}^+$  no canal de  $\text{K}^+$ ; ver Figura 11-47.)

A formação de ATP (ou GTP) à custa da energia liberada pela descarboxilação oxidativa do  $\alpha$ -cetoglutarato é uma fosforilação ao nível do substrato, como a síntese de ATP nas reações glicolíticas catalisadas por gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e piruvato-cinase (ver Figura 14-2). O GTP formado pela succinil-CoA-sintetase pode doar o grupo fosfato terminal ao ADP para formar ATP, em uma reação reversível catalisada pela **nucleosídeo-difosfato-cinase** (p. 526):



**FIGURA 16-13** A reação da succinil-CoA-sintetase. **(a)** Na etapa 1, a CoA da succinil-CoA ligada à enzima é substituída por um grupo fosfato, formando um acil-fosfato de alta energia. Na etapa 2, o succinil-fosfato doa o grupo fosfato para um resíduo de His da enzima, originando uma fosfo-histidil-enzima de alta energia. Na etapa 3, o grupo fosfato é transferido do resíduo de His ao fosfato terminal do GDP (ou ADP), formando GTP (ou ATP). **(b)** Sítio ativo da succinil-CoA-sintetase de *E. coli* (derivado da estrutura de PDB ID 1SCU). O sítio ativo inclui parte de ambas as subunidades,  $\alpha$  (em azul) e  $\beta$  (em marrom). As hélices carregadas (azul, marrom) posicionam as cargas parciais positivas do dipolo da hélice próximas ao grupo fosfato de  $\text{P-His}^{246}$  na cadeia  $\alpha$ , estabilizando a enzima com a fosfo-histidina. As enzimas de mamíferos e bactérias apresentam seqüências de aminoácidos e estruturas tridimensionais similares.

Desse modo, o resultado líquido da atividade de cada isoenzima da succinil-CoA-sintetase é a conservação de energia como ATP. Não há variação de energia livre na reação da nucleosídeo-difosfato-cinase; ATP e GTP são energeticamente equivalentes.



**QUADRO 16-2 Sintases e sintetases; ligases e liases; cinases, fosfatases e fosforilases: sim, os nomes são confusos!**

A citrato-sintase é uma das muitas enzimas que catalisam reações de condensação, que geram um produto quimicamente mais complexo do que os precursores. **Sintases** catalisam reações de condensação nas quais nenhum nucleosídeo trifosfatado (ATP, GTP e assim por diante) é necessário como fonte de energia. **Sintetases** catalisam reações de condensação que *de fato* utilizam ATP ou outro nucleosídeo trifosfatado como uma fonte de energia para a reação sintética. A succinil-CoA-sintetase é uma destas enzimas. **Ligases** (do latim *ligare*, “amarrar”) são enzimas que catalisam reações de condensação nas quais dois átomos são unidos, utilizando ATP ou outra fonte de energia. (Portanto, sintetases são ligases.) A DNA-ligase, por exemplo, conserta quebras em moléculas de DNA, utilizando energia suprida por ATP ou  $\text{NAD}^+$ ; essa enzima é largamente utilizada na engenharia genética para unir pedaços de DNA. Ligases não devem ser confundidas com **liases**, enzimas que catalisam clivagens (ou, na reação inversa, adições), nas quais ocorrem rearranjos eletrônicos. O complexo da PDH, que remove o  $\text{CO}_2$  da molécula de piruvato em uma reação de oxidação, é um membro da ampla classe das liases.

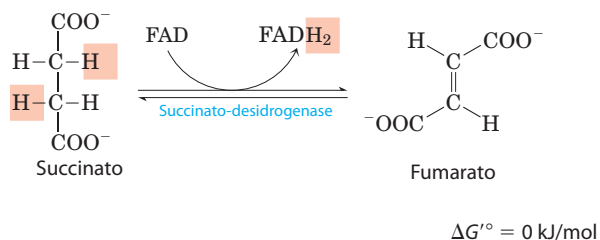
O nome **cinase** é aplicado a enzimas que transferem um grupo fosfato de um nucleosídeo trifosfatado, como o ATP, para uma molécula aceptora – um açúcar (como a hexocinase e a glicocinase), uma proteína (como a glicogênio-fosforilase-cinase), outro nucleotídeo (como a nucleosídeo-difosfato-cinase) ou um intermediário metabólico, como o oxaloacetato (como a PEP-carboxicinas). A reação catalisada por uma cinase é uma *fosforilação*. Por outro lado, a *fosforólise* é uma reação de substituição, na qual o fosfato inorgânico ataca uma ligação química e é covalentemente ligado à molécula no ponto de quebra da ligação. Tais reações são catalisadas por **fosforilases**. A glicogênio-fosforilase, por exemplo, catalisa a fosforólise do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato. A *desfosforilação*, remoção de um grupo fosfato a partir de um éster de fosfato, é catalisada por **fosfatases**, que utilizam

a água como espécie atacante. A frutose-bifosfatase-1 converte frutose-1,6-bifosfato a frutose-6-fosfato na gliconeogênese, e a fosforilase- $\alpha$ -fosfatase retira os grupos fosfato dos resíduos de fosfoserina na glicogênio-fosforilase fosforilada. Ufa!

Infelizmente, essas descrições dos tipos de enzimas se sobrepõem, e muitas enzimas são comumente chamadas por dois ou mais nomes. A succinil-CoA-sintetase, por exemplo, também é chamada de succinato-tiocinase; a enzima é uma sintetase no ciclo do ácido cítrico e uma cinase quando age no sentido da síntese de succinil-CoA. Isso expõe outra fonte de confusão na nomenclatura de enzimas. Uma enzima pode ter sido descoberta com a utilização de um experimento no qual, por exemplo, A é convertido em B. A enzima é, então, chamada de acordo com essa reação. Trabalhos posteriores, entretanto, podem mostrar que, na célula, a enzima funciona principalmente convertendo B a A. Geralmente, o primeiro nome continua a ser utilizado, embora a função metabólica da enzima fosse mais bem descrita nomeando-a pela reação inversa. A enzima glicolítica piruvato-cinase ilustra esta situação (p. 554). Para um principiante na bioquímica, essa duplicação da nomenclatura pode ser desorientadora. Comissões internacionais têm feito esforços heróicos para sistematizar a nomenclatura das enzimas (ver Tabela 6-3 para um breve resumo do sistema), porém alguns nomes sistemáticos são muito longos e complicados e não são utilizados no dia a dia bioquímico.

Ao longo deste livro, tentou-se utilizar os nomes enzimáticos mais comumente utilizados pelos bioquímicos e chamar a atenção para os casos nos quais uma enzima tem mais de um nome amplamente utilizado. Para informações atualizadas sobre a nomenclatura enzimática, recorra às recomendações da Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology; [www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/nomenclature/](http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/nomenclature/)).

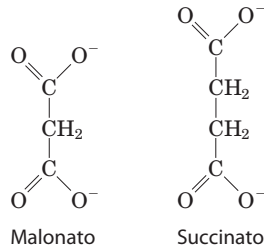
**6 Oxidação do succinato a fumarato.** O succinato formado a partir da succinil-CoA é oxidado a **fumarato** pela flavoproteína **succinato-desidrogenase**:



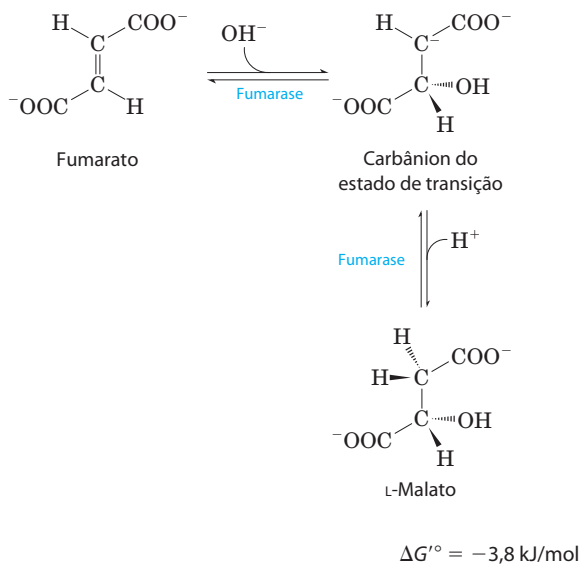
Em eucariotos, a succinato-desidrogenase está firmemente ligada à membrana mitocondrial interna; em bac-

térias, está ligada à membrana plasmática. A enzima contém três grupos ferro-enxofre diferentes e uma molécula de FAD covalentemente ligada (ver Figura 19-10). Os elétrons do succinato passam pelo FAD e pelos centros de ferro-enxofre antes de entrarem na cadeia de transportadores de elétrons da membrana mitocondrial interna (da membrana plasmática em bactérias). O fluxo dos elétrons do succinato ao longo desses transportadores até o aceptor de elétrons final,  $\text{O}_2$ , é acoplado à síntese de aproximadamente 1,5 molécula de ATP por par de elétrons (fosforilação acoplada à respiração). Malonato, análogo do succinato normalmente ausente nas células, é um forte inibidor competitivo da succinato-desidrogenase, e sua adição à mitocôndria bloqueia a atividade do ciclo do ácido cítrico.

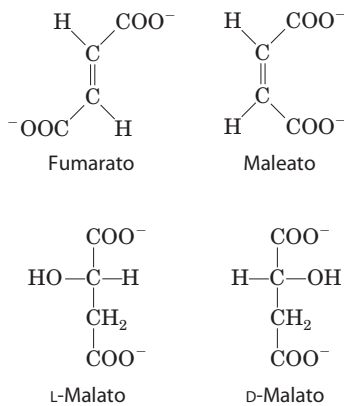




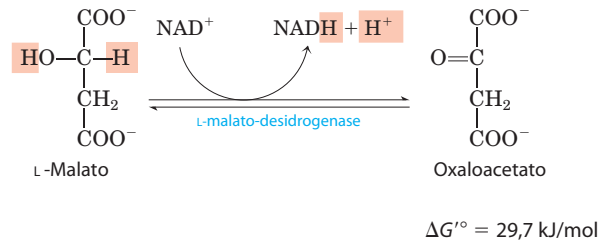
7 **Hidratação do fumarato a malato.** A hidratação reversível do fumarato a **L-malato** é catalisada pela **fumarase** (formalmente, **fumarato-hidratase**). O estado de transição dessa reação é um carbânion:



Essa enzima é altamente estereoespecífica; ela catalisa a hidratação da ligação dupla *trans* do fumarato, mas não a da ligação dupla *cis* do maleato (o isômero *cis* do fumarato). Na direção inversa (de L-malato para fumarato), a fumarase é igualmente estereoespecífica: D-malato não é um substrato.



8 **Oxidação do malato a oxaloacetato.** Na última reação do ciclo do ácido cítrico, a **L-malato-desidrogenase** ligada ao NAD catalisa a oxidação de L-malato a oxaloacetato:



O equilíbrio dessa reação é muito deslocado para a esquerda sob as condições termodinâmicas padrão, porém, nas células intactas, o oxaloacetato é continuamente removido pela reação altamente exergônica da citrato-sintase (etapa 2 da Figura 16-7). Isso mantém a concentração celular de oxaloacetato extremamente baixa ( $< 10^{-6} \text{ M}$ ), deslocando a reação da malato-desidrogenase no sentido da formação de oxaloacetato.

Embora as reações individuais do ciclo do ácido cítrico tenham sido inicialmente elucidadas *in vitro*, utilizando tecido muscular macerado, a via e sua regulação também têm sido intensamente estudadas *in vivo*. Com a utilização de precursores marcados radioativamente, como [ $^{14}\text{C}$ ]piruvato e [ $^{14}\text{C}$ ]acetato, os pesquisadores têm delineado o destino de átomos de carbono individuais durante o ciclo do ácido cítrico. Alguns dos experimentos iniciais com isótopos, entretanto, produziram resultados inesperados, que originaram considerável controvérsia sobre a via e o mecanismo do ciclo do ácido cítrico. Na verdade, esses experimentos pareciam inicialmente mostrar que o citrato não era o primeiro ácido tricarboxílico formado. O Quadro 16-3 conta alguns detalhes desse episódio da história da pesquisa do ciclo do ácido cítrico. O fluxo metabólico ao longo do ciclo agora pode ser monitorado em tecidos vivos com o uso de precursores marcados com  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia por RMN. Como o sinal de RMN é exclusivo do composto contendo  $^{13}\text{C}$ , os bioquímicos podem determinar o movimento dos carbonos dos precursores em cada intermediário do ciclo e em compostos derivados destes intermediários. Essa técnica é bastante promissora para os estudos da regulação do ciclo do ácido cítrico e suas interconexões com outras vias metabólicas, como a glicólise.

### A energia das oxidações do ciclo é conservada de maneira eficiente

Até aqui foi esmiuçada uma rodada completa do ciclo do ácido cítrico (Figura 16-14). Um grupo acetil com dois carbonos entra no ciclo combinando-se com o oxaloacetato. Dois átomos de carbono saem do ciclo na forma de  $\text{CO}_2$  pela oxidação do isocitrato e do  $\alpha$ -cetoglutarato. A energia liberada por estas oxidações foi conservada pela redução de três  $\text{NAD}^+$  e um  $\text{FAD}$  e pela produção de um  $\text{ATP}$  ou  $\text{GTP}$ . No final do ciclo, uma molécula de oxaloacetato foi regenerada. Lembre que os dois átomos de carbono que emergem como  $\text{CO}_2$  não são os mesmos dois carbonos que entram na forma de grupo acetil; rodadas adicionais são necessárias para que estes carbonos sejam liberados na forma de  $\text{CO}_2$  (Figura 16-7).



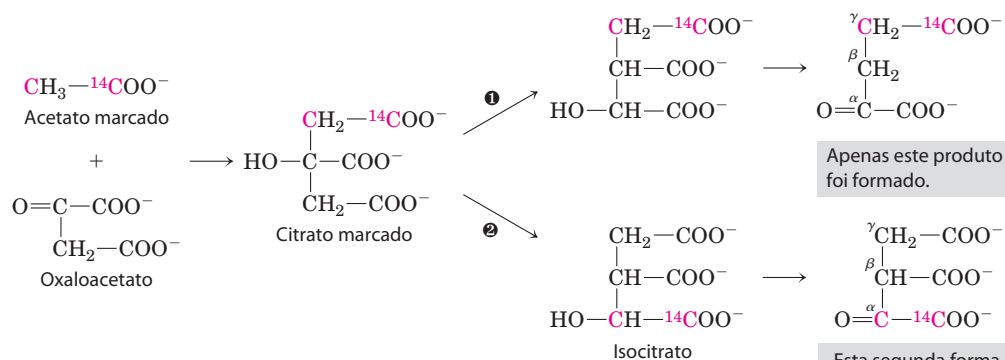
### QUADRO 16-3 Citrato: molécula simétrica que reage assimetricamente

Quando os compostos enriquecidos no isótopo de carbono pesado  $^{13}\text{C}$  e nos isótopos de carbono radioativos  $^{11}\text{C}$  e  $^{14}\text{C}$  se tornaram disponíveis cerca de 60 anos atrás, eles foram imediatamente utilizados para definir o rumo dos átomos de carbono durante o ciclo do ácido cítrico. Um desses experimentos desencadeou a controvérsia sobre a função do citrato. Acetato marcado no grupo carboxil (designado  $[1-^{14}\text{C}]$ acetato) foi incubado sob condições aeróbias com uma preparação de tecido animal. O acetato é enzimaticamente convertido a acetil-CoA nos tecidos animais, e a via do carbono do carboxil marcado, agora presente no grupo acetil, poderia assim ser determinada durante o ciclo de reações.  $\alpha$ -Cetogluturato foi isolado do tecido após a incubação, sendo então degradado quimicamente por meio de reações químicas conhecidas para estabelecer a(s) posição(ões) do carbono isotópico.

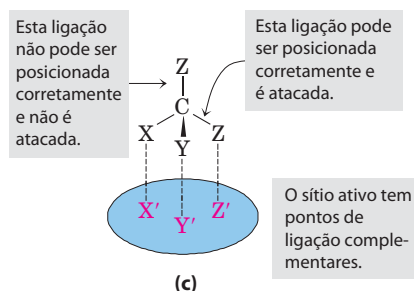
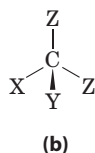
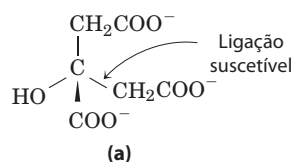
Esperava-se que a condensação de oxaloacetato não marcado com acetato marcado no carboxil produzisse citrato marcado em um dos dois grupos carboxil primários. O citrato é uma molécula simétrica, seus dois grupos carboxil terminais são indistinguíveis. Conseqüentemente, era esperado que metade das moléculas de citrato marcadas originasse  $\alpha$ -cetogluturato marcado no grupo carboxil  $\alpha$  e que a outra metade originasse  $\alpha$ -cetogluturato marcado no grupo carboxil  $\gamma$ : isto é, esperava-se que o  $\alpha$ -cetogluturato

isolado fosse uma mistura dos dois tipos de moléculas marcadas (Figura Q-1, vias 1 e 2). Contrariando essas expectativas, o  $\alpha$ -cetogluturato marcado isolado da suspensão de tecido continha  $^{14}\text{C}$  somente no grupo carboxil  $\gamma$  (Figura Q-1, via 1). Os investigadores concluíram que o citrato (ou qualquer outra molécula simétrica) não poderia ser um intermediário da via entre acetato e  $\alpha$ -cetogluturato. Em vez disso, um ácido tricarbóxico assimétrico, presumivelmente *cis*-aconitato ou isocitrato, deveria ser o primeiro produto formado pela condensação de acetato e oxaloacetato.

Em 1948, entretanto, Alexandre Ogston mostrou que, embora o citrato não tenha centro quiral (ver Figura 1-20), ele tem *potencial* para reagir assimetricamente se a enzima com a qual ele interage possuir um sítio ativo assimétrico. Ele sugeriu que o sítio ativo da aconitase tinha três pontos aos quais o citrato deveria estar ligado e que o citrato deveria posicionar-se de maneira a se unir especificamente a esses três pontos. Como visto na Figura Q-2, a ligação do citrato aos três pontos poderia ocorrer de uma maneira apenas, e isso acarretaria na formação de um único tipo de  $\alpha$ -cetogluturato marcado. Moléculas orgânicas como o citrato, sem centro quiral, mas potencialmente capazes de reagirem assimetricamente com um sítio ativo assimétrico, são atualmente chamadas de **moléculas pró-quirais**.

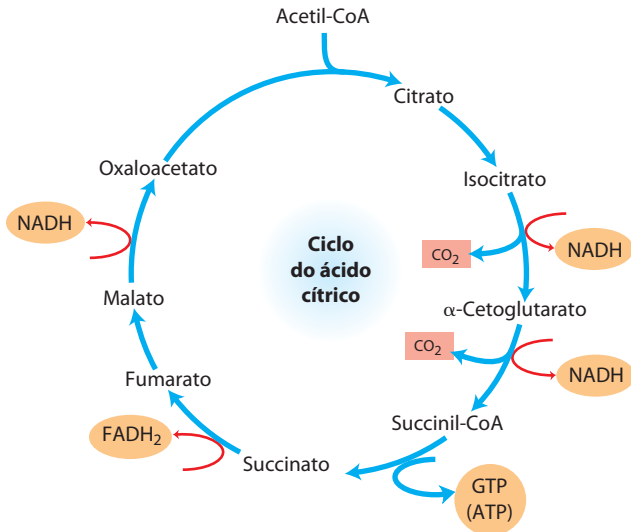


**FIGURA Q-1** Incorporação do carbono isotópico ( $^{14}\text{C}$ ) do grupo acetil marcado ao  $\alpha$ -cetogluturato durante o ciclo do ácido cítrico. Os átomos de carbono do grupo acetil reagente estão representados em vermelho.



**FIGURA Q-2** A natureza pró-quiral do citrato. (a) Estrutura do citrato; (b) representação esquemática do citrato: X =  $-\text{OH}$ ; Y =  $-\text{COO}^-$ ; Z =  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ . (c) Encaixe complementar correto do citrato ao sítio de ligação

da aconitase. Existe apenas uma maneira na qual os três grupos especificados do citrato podem encaixar-se aos três pontos do sítio de ligação. Portanto, apenas um dos dois grupos  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  liga-se à aconitase.



**FIGURA 16-14** Produtos de uma rodada do ciclo do ácido cítrico A cada rodada do ciclo do ácido cítrico, três moléculas de NADH, uma de FADH<sub>2</sub>, uma de GTP (ATP) e duas de CO<sub>2</sub> são liberadas em reações de descarboxilação oxidativa. Aqui, e em algumas das figuras seguintes, todas as reações do ciclo estão representadas como se elas ocorressem em apenas uma direção, lembre-se, entretanto, que a maioria das reações são reversíveis (ver Figura 16-7).

Embora o ciclo do ácido cítrico gere diretamente somente um ATP por rodada (na conversão de succinil-CoA a succinato), as quatro etapas de oxidação do ciclo abastecem a cadeia respiratória, via NADH e FADH<sub>2</sub>, com um grande fluxo de elétrons e, assim, levam à formação de um grande número de moléculas de ATP durante a forforilação oxidativa.

Foi visto no Capítulo 14 que o rendimento energético da produção de duas moléculas de piruvato a partir de uma molécula de glicose é de 2 ATP e 2 NADH. Na fosforilação oxidativa (Capítulo 19), a passagem de dois elétrons do NADH ao O<sub>2</sub> impele a formação de aproximadamente 2,5 ATP, e a passagem de dois elétrons do FADH<sub>2</sub> ao O<sub>2</sub> rende cerca de 1,5 ATP. Essa estequiometria nos permite calcular o rendimento global em ATP da oxidação completa da glicose. Quando ambas as moléculas de piruvato são oxidadas a 6 CO<sub>2</sub> via complexo da piruvato-desidrogenase e ciclo do ácido cítrico, e os elétrons são transferidos ao O<sub>2</sub> via fosforilação oxidativa, 32 ATPs são obtidos por molécula de glicose (Tabela 16-1). Em números redondos, isto representa a conservação de 32 × 30,5 kJ/mol = 976 kJ/mol, ou 34% do máximo teórico de cerca de 2.840 kJ/mol disponibilizados pela oxidação completa da glicose. Esses cálculos utilizam as variações de energia livre padrão; quando corrigidos para a energia livre de fato requerida para a formação de ATP dentro das células (ver Problema Resolvido 13-2, p. 519), a eficiência calculada do processo aproxima-se de 65%.

**Por que a oxidação do citrato é tão complicada?**

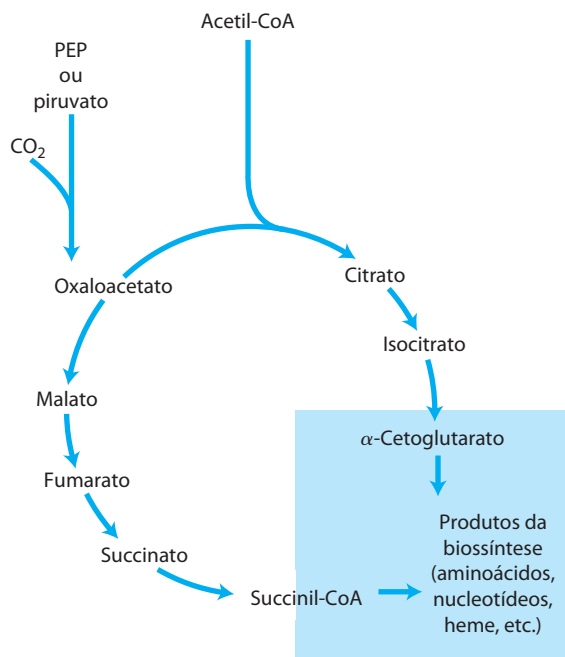
Um processo cíclico em oito etapas para a oxidação de simples grupos acetil de dois carbonos a CO<sub>2</sub> pode parecer desnecessariamente complicado e em discordância com o princípio biológico de economia máxima. A função do ciclo do ácido cítrico, entretanto, não se restringe à oxidação do acetato. Essa via é o pivô do metabolismo intermediário. Produtos finais com quatro e cinco carbonos originários de muitos processos catabólicos são utilizados para alimentar o ciclo e servirem como combustíveis. Oxaloacetato e α-cetogluturato, por exemplo, são produzidos a partir de aspartato e glutamato, respectivamente, quando proteínas

**TABELA 16-1** Estequiometria da redução de coenzimas e formação de ATP na oxidação aeróbia da glicose via glicólise, reação do complexo da piruvato-desidrogenase, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa

Reação	Número de ATP ou coenzimas reduzidas diretamente formados	Número de ATP formados no final do processo*
Glicose → glicose-6-fosfato	-1 ATP	-1
Frutose-6-fosfato → frutose-1,6-bifosfato	-1 ATP	-1
2 Gliceraldeído-3-fosfato → 2 1,3-bifosfoglicerato	2 NADH	3 ou 5 <sup>†</sup>
2 1,3-Bifosfoglicerato → 2 3-fosfoglicerato	2 ATP	2
2 Fosfoenolpiruvato → 2 piruvato	2 ATP	2
2 Piruvato → 2 acetil-CoA	2 NADH	5
2 Isocitrato → 2 α-cetogluturato	2 NADH	5
2 α-Cetogluturato → 2 succinil-CoA	2 NADH	5
2 Succinil-CoA → 2 succinato	A ATP (ou 2 GTP)	2
2 Succinato → 2 fumarato	2 FADH <sub>2</sub>	3
2 Malato → 2 oxaloacetato	2 NADH	5
<b>Total</b>		<b>30-32</b>

\* Calculado como 2,5 ATP por NADH e 1,5 ATP por FADH<sub>2</sub>. Um valor negativo indica consumo.

<sup>†</sup> O número formado é 3 ou 5, dependendo do mecanismo utilizado para a transferência de equivalentes de NADH do citosol para a matriz mitocondrial; ver Figuras 19-30 e 19-31.



**FIGURA 16-15** Precusores biossintéticos produzidos por um ciclo do ácido cítrico incompleto em bactérias anaeróbicas. Estes organismos anaeróbicos carecem de  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase e, portanto, não podem efetuar o ciclo do ácido cítrico completo.  $\alpha$ -Cetoglutarato e succinil-CoA são precursores em diversas vias biossintéticas. (Ver Figura 16-14 para o sentido “normal” destas reações no ciclo do ácido cítrico.)

são degradadas. Sob determinadas circunstâncias metabólicas, intermediários são drenados do ciclo para serem utilizados como precursores em diferentes vias biossintéticas.

O ciclo do ácido cítrico, como todas as outras vias metabólicas, é um produto da evolução, e essa evolução ocorreu em grande parte antes do surgimento dos organismos aeróbios. Ele não necessariamente representa a via *mais curta* entre acetato e  $\text{CO}_2$ , mas é a via que, ao longo do tempo, tem conferido a maior vantagem seletiva. Anaeróbios primitivos muito provavelmente utilizavam algumas das reações do ciclo do ácido cítrico em processos biossintéticos lineares. Na verdade, alguns microrganismos atuais utilizam um ciclo do ácido cítrico incompleto não como fonte de energia, mas de precursores biossintéticos (Figura 16-15). Esses organismos utilizam as três primeiras reações do ciclo para sintetizarem  $\alpha$ -cetoglutarato, porém, como carecem de  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase, não podem realizar o conjunto completo das reações do ciclo do ácido cítrico. O que esses organismos de fato possuem são as quatro enzimas que catalisam a conversão reversível de oxaloacetato a succinil-CoA e podem produzir malato, fumarato, succinato e succinil-CoA a partir de oxaloacetato, em uma inversão do sentido “normal” (oxidativo) do fluxo do ciclo. Essa via é uma fermentação, e o NADH produzido pela oxidação do isocitrato é reciclado a  $\text{NAD}^+$  pela redução do oxaloacetato a succinato.

Com a evolução das cianobactérias, que produzem  $\text{O}_2$  a partir de água, a atmosfera da Terra tornou-se aeróbia e os organismos sofreram uma pressão seletiva para o desenvolvimento do metabolismo aeróbio, o qual é muito mais eficiente do que a fermentação anaeróbia.

## Os componentes do ciclo do ácido cítrico são importantes intermediários da biossíntese

Em organismos aeróbios, o ciclo do ácido cítrico é uma **via anfibólica**, ou seja, que serve a processos catabólicos e anabólicos. Além do papel no catabolismo oxidativo de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, o ciclo fornece precursores para muitas vias de biossíntese (Figura 16-16), por meio das reações que serviram a esse mesmo propósito em ancestrais anaeróbios.  $\alpha$ -Cetoglutarato e oxaloacetato podem, por exemplo, ser os precursores dos aminoácidos aspartato e glutamato por simples transaminação (Capítulo 22). Por meio do aspartato e do glutamato, os carbonos do oxaloacetato e  $\alpha$ -cetoglutarato são, então, utilizados para a síntese de outros aminoácidos, assim como para a síntese de nucleotídeos de purinas e pirimidinas. O oxaloacetato é convertido em glicose na gliconeogênese (ver Figura 15-13). A succinil-CoA é um intermediário central para a síntese do anel porfirínico dos grupos heme, que agem como transportadores de oxigênio (na hemoglobina e na mioglobina) e transportadores de elétrons (nos citocromos) (ver Figura 22-25). E o citrato produzido por alguns organismos é utilizado comercialmente para uma grande variedade de propósitos.

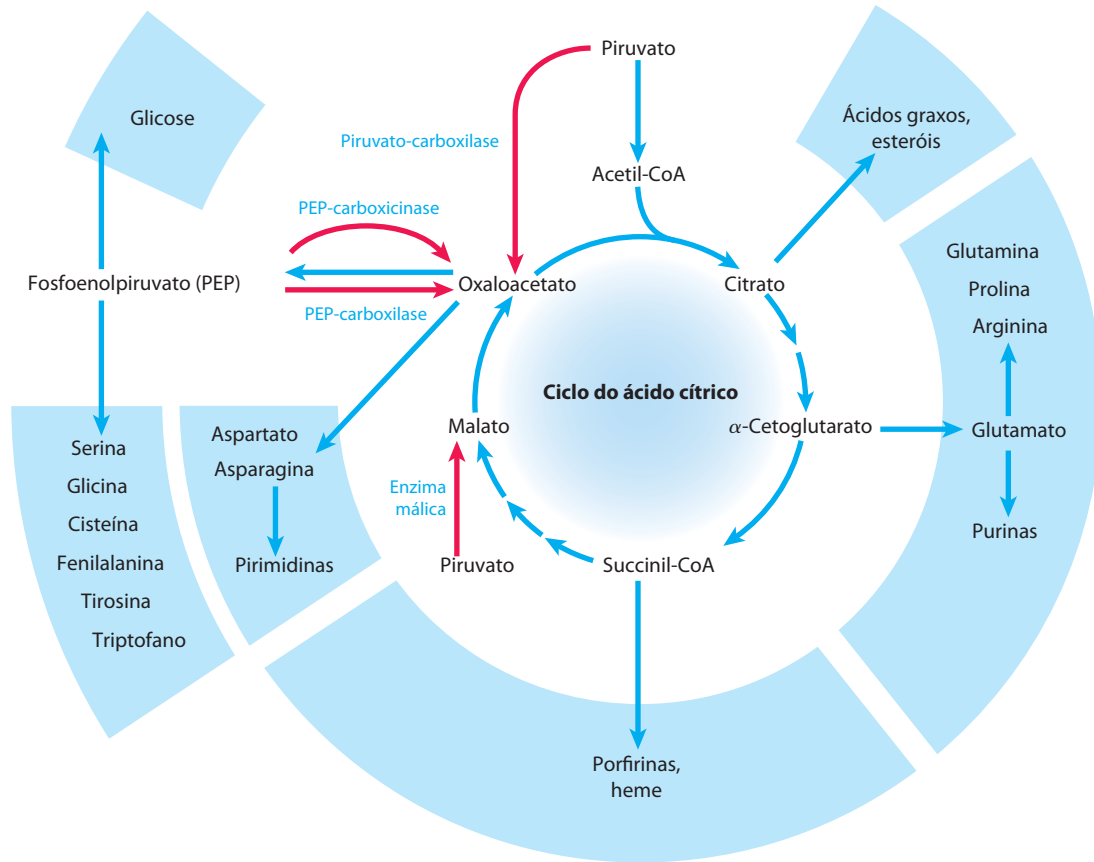
## Reações anapleróticas repõem os intermediários do ciclo do ácido cítrico

Conforme os intermediários do ciclo do ácido cítrico são removidos para servirem como precursores na biossíntese, eles são repostos por **reações anapleróticas** (Figura 16-16; Tabela 16-2). Sob circunstâncias normais, há um equilíbrio dinâmico nas reações que desviam os intermediários a outras vias e os repõem, de modo que as concentrações dos intermediários do ciclo do ácido cítrico permaneçam quase constantes.

A Tabela 16-2 mostra as reações anapleróticas mais comuns, as quais, em vários tecidos e organismos, convertem ou piruvato ou fosfoenolpiruvato a oxaloacetato ou malato. A reação anaplerótica mais importante no fígado e nos rins de mamíferos é a carboxilação reversível do piruvato pelo  $\text{CO}_2$  para a formação de oxaloacetato, catalisada pela **piruvato-carboxilase**. Quando o ciclo do ácido cítrico está deficiente em oxaloacetato ou qualquer outro intermediário, o piruvato é carboxilado para produzir mais oxaloacetato. A adição enzimática de um grupo carboxil ao piruvato requer energia, que é suprida pelo ATP – a energia livre necessária para unir um grupo carboxil ao piruvato é aproximadamente igual à energia livre disponibilizada pelo ATP.

A piruvato-carboxilase é uma enzima de regulação essencialmente inativa na ausência de acetil-CoA, seu modulador alostérico positivo. Sempre que a acetil-CoA, o combustível do ciclo do ácido cítrico, está presente em excesso, ela estimula a reação da piruvato-carboxilase para a produção de mais oxaloacetato, permitindo que o ciclo utilize mais acetil-CoA na reação da citrato-sintase.

As outras reações anapleróticas mostradas na Tabela 16-2 também são reguladas de modo a manter o nível dos intermediários suficientemente alto para sustentar a ativi-



**FIGURA 16-16** Papel do ciclo do ácido cítrico no anabolismo. Intermediários do ciclo do ácido cítrico são desviados como precursores de mui-

tas vias biossintéticas. Em vermelho aparecem quatro reações anapleróticas que repõem os intermediários do ciclo esgotados (ver Tabela 16-2).

dade do ciclo do ácido cítrico. A fosfoenolpiruvato-carboxilase, por exemplo, é ativada pelo intermediário glicolítico frutose-1,6-bifosfato, que se acumula quando o ciclo do ácido cítrico processa muito lentamente o piruvato gerado pela glicólise.

### A biotina da piruvato-carboxilase transporta grupos CO<sub>2</sub>

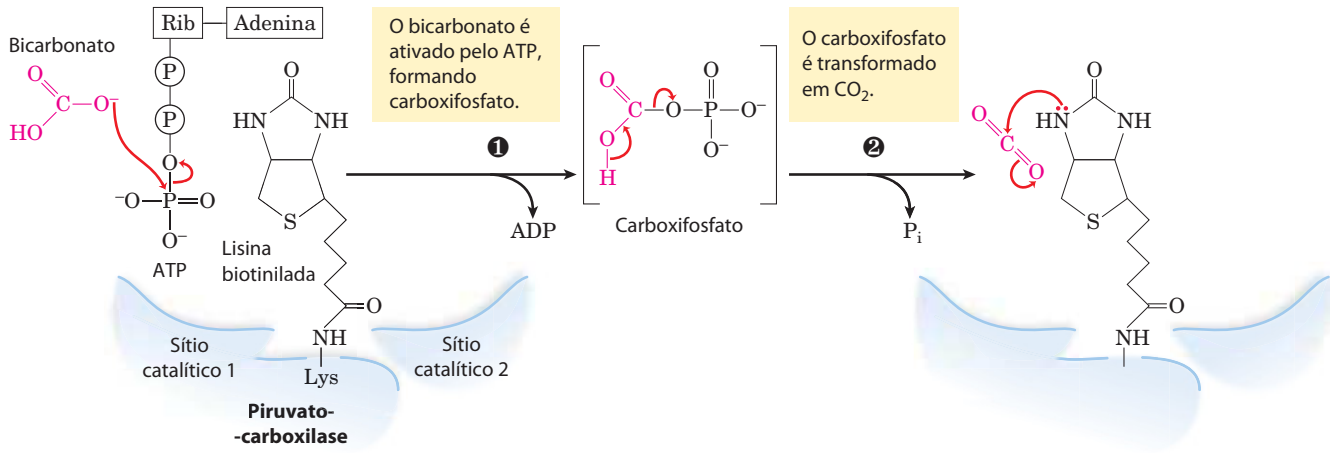
A reação da piruvato-carboxilase requer a vitamina **biotina** (Figura 16-17), que é o grupo prostético da enzima. A biotina tem uma função-chave em muitas reações de carboxilação. Ela é um transportador especializado dos gru-

pos de um carbono em sua forma mais oxidada: CO<sub>2</sub>. (A transferência de grupos de um carbono em formas mais reduzidas é mediada por outros cofatores, particularmente tetra-hidrofolato e S-adenosilmetionina, como descrito no Capítulo 18.) Os grupos carboxil são ativados em uma reação que une o CO<sub>2</sub> à biotina ligada à enzima com consumo de ATP. Esse CO<sub>2</sub> “ativado” passa a um aceptor (piruvato, nesse caso) em uma reação de carboxilação.

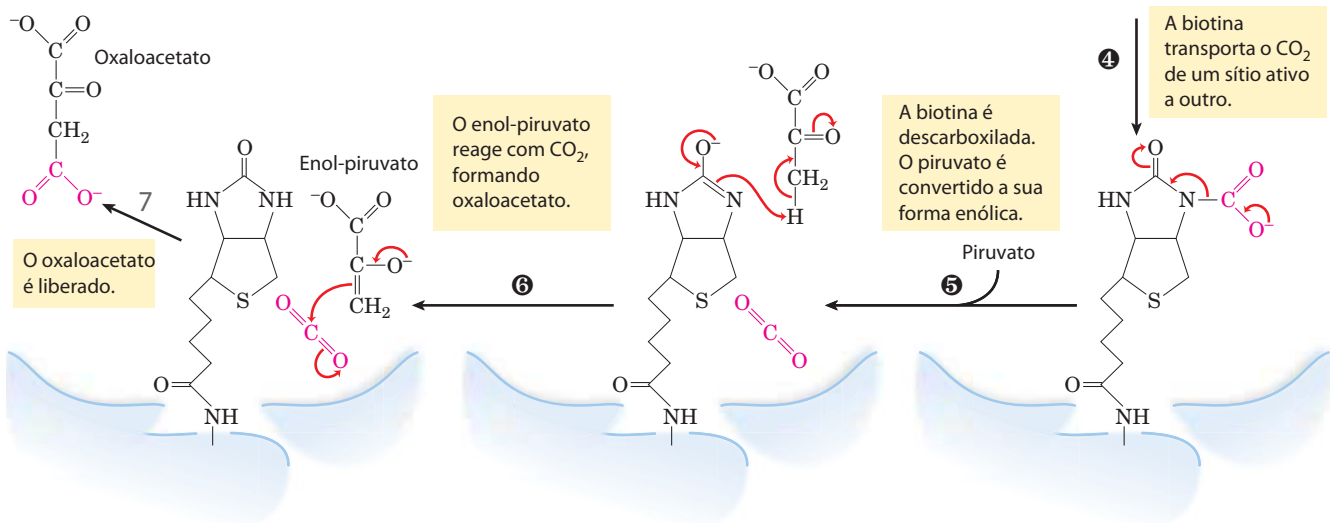
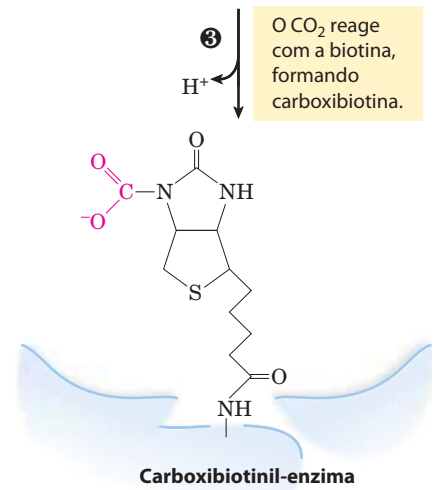
A piruvato-carboxilase tem quatro subunidades idênticas, cada uma contendo uma molécula de biotina ligada covalentemente por uma ligação amida com o grupo amino ε de um resíduo de Lys específico presente no sítio ativo da enzima. A carboxilação do piruvato ocorre em duas etapas

**TABELA 16-2** Reações anapleróticas

Reação	Tecido(s)/organismo(s)
$\text{Piruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Piruvato-carboxilase}} \text{oxaloacetato} + \text{ADP} + \text{P}_i$	Fígado, rins
$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \xrightleftharpoons{\text{PEP-carboxicinase}} \text{oxaloacetato} + \text{GTP}$	Coração, músculo esquelético
$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{HCO}_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP-carboxilase}} \text{oxaloacetato} + \text{P}_i$	Vegetais superiores, leveduras, bactérias
$\text{Piruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightleftharpoons{\text{Enzima málica}} \text{malato} + \text{NAD(P)}^+$	Amplamente distribuída em eucariotos e bactérias



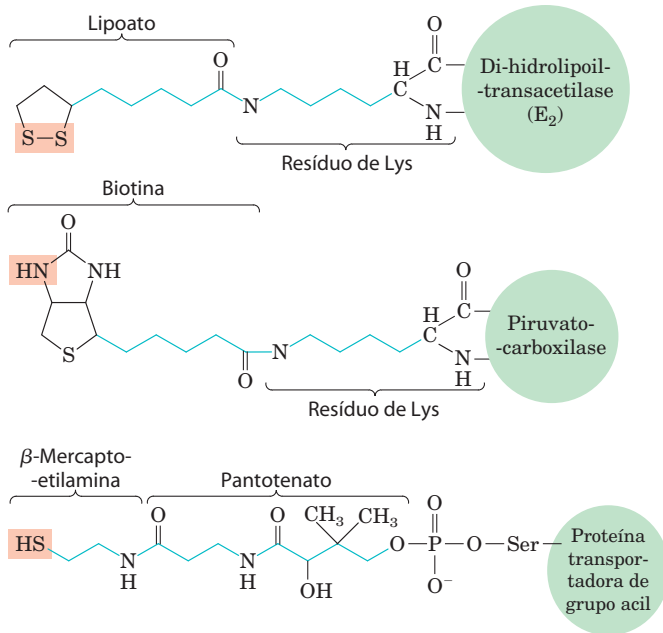
**MECANISMO-FIGURA 16-17 O papel da biotina na reação catalisada pela piruvato-carboxilase.** A biotina está ligada à enzima por uma ligação amida com o grupo ε-amino de um resíduo de Lys, formando a enzima biotinilada. A reação de carboxilação mediada pela biotina ocorre em duas fases, geralmente catalisadas em sítios ativos separados da enzima, como exemplificado pela reação da piruvato-carboxilase. Na primeira fase (etapas 1 a 3), o bicarbonato é convertido a CO<sub>2</sub>, mais ativo, sendo então utilizado para carboxilar a biotina. A biotina atua como um transportador, carregando o CO<sub>2</sub> de um sítio ativo ao outro, localizado em um monômero adjacente da enzima tetramérica (etapa 4). Na segunda fase (etapas 5 a 7), catalisada neste segundo sítio ativo, o CO<sub>2</sub> reage com o piruvato para formar oxaloacetato.



(Figura 16-17): primeiro, um grupo carboxil derivado do HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> é ligado à biotina, sendo então transferido ao piruvato para formar oxaloacetato. Essas duas etapas ocorrem em sítios ativos separados; o longo e flexível braço da biotina transfere os grupos carboxil ativados do primeiro sítio

ativo (em um dos monômeros do tetrâmero) ao segundo (no monômero adjacente), funcionando muito similarmente ao longo braço de lipoil-lisina de E<sub>2</sub> no complexo da PDH (Figura 16-6) e ao longo braço da porção similar a CoA da proteína transportadora de acilas envolvida na síntese de





**FIGURA 16-18 Conectores biológicos.** Os cofatores lipoato, biotina e a combinação de  $\beta$ -mercaptoetilamina e pantotenato formam longos braços flexíveis (em azul) nas enzimas às quais estão covalentemente ligados, atuando como conectores que movem os intermediários de um sítio ativo ao outro. O grupo sombreado em vermelho é, em cada caso, o ponto de ligação do intermediário ativado ao conector.

ácidos graxos (ver Figura 21-5); essas proteínas são comparadas na **Figura 16-18**. O lipoato, a biotina e o pantotenato entram nas células por meio do mesmo transportador, todos se tornam covalentemente ligados a proteínas por reações similares, e todos originam um conector flexível que possibilita que os intermediários da reação se movam de um sítio ativo a outro em um complexo enzimático sem dissociarem-se do complexo – isto é, todos participam da canalização do substrato.

A biotina é uma vitamina essencial da dieta humana; ela é abundante em muitos alimentos e é sintetizada por bactérias intestinais. A deficiência de biotina é rara, mas pode algumas vezes ser causada por uma dieta rica em ovos crus. A clara do ovo contém grande quantidade da proteína **avidina** ( $M_r$  70.000), que se liga com muita afinidade à biotina e impede sua absorção no intestino. A avidina do ovo pode ser um mecanismo de defesa para o potencial embrião da ave, inibindo o crescimento de bactérias. Quando os ovos são cozidos, a avidina é desnaturada (e, portanto, inativada), juntamente com todas as outras proteínas da clara do ovo. A avidina purificada é um reagente muito útil na bioquímica e na biologia celular. Uma proteína covalentemente ligada à biotina (obtida experimentalmente ou produzida *in vivo*) pode ser purificada por cromatografia de afinidade (ver Figura 3-17c) com base na forte afinidade da biotina pela avidina. A proteína é, então, eluída da coluna com excesso de biotina livre. A afinidade muito alta da biotina pela avidina também é utilizada em laboratório para unir duas estruturas, agindo como cola molecular (ver Figura 19-27).

## RESUMO 16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico

- ▶ O ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs, ciclo do ácido tricarboxílico [TCA]) é uma via catabólica central e praticamente universal por meio da qual os compostos derivados da degradação de carboidratos, gorduras e proteínas são oxidados a  $\text{CO}_2$ , com a maior parte da energia da oxidação temporariamente armazenada nos transportadores de elétrons  $\text{FADH}_2$  e  $\text{NADH}$ . Durante o metabolismo aeróbico, esses elétrons são transferidos ao  $\text{O}_2$ , e a energia do fluxo de elétrons é capturada na forma de ATP.
- ▶ A acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico (na mitocôndria de eucariotos, no citosol em bactérias) quando a citrato-sintase catalisa sua condensação com o oxaloacetato para a formação de citrato.
- ▶ Em sete reações sequenciais, incluindo duas descarboxilações, o ciclo do ácido cítrico converte citrato a oxaloacetato e libera dois  $\text{CO}_2$ . A via é cíclica, de modo que os intermediários não são exauridos; para cada oxaloacetato consumido na via, um é produzido.
- ▶ Para cada acetil-CoA oxidada pelo ciclo do ácido cítrico, o ganho de energia consiste em três moléculas de  $\text{NADH}$ , uma de  $\text{FADH}_2$  e um nucleosídeo trifosfatado (ATP ou GTP).
- ▶ Além da acetil-CoA, qualquer composto que origine um intermediário do ciclo do ácido cítrico com quatro ou cinco carbonos – por exemplo, os produtos da degradação de muitos aminoácidos – podem ser oxidados pelo ciclo.
- ▶ O ciclo do ácido cítrico é anfibólico, servindo ao catabolismo e ao anabolismo; os intermediários do ciclo podem ser desviados e utilizados como material de partida para diversos produtos da biossíntese.
- ▶ Quando os intermediários são desviados do ciclo do ácido cítrico para outras vias, eles são repostos por algumas reações anapleróticas, que produzem intermediários de quatro carbonos por meio da carboxilação de compostos de três carbonos; essas reações são catalisadas por piruvato-carboxilase, PEP-carboxicinase, PEP-carboxilase e enzima málica. Enzimas que catalisam carboxilações comumente utilizam a biotina para ativar o  $\text{CO}_2$  e transportá-lo a aceptores, como piruvato ou fosfoenolpiruvato.

## 16.3 Regulação do ciclo do ácido cítrico

Como foi analisado no Capítulo 15, a regulação de enzimas-chave em vias metabólicas, por meio de efetores alostéricos e modificação covalente, garante a produção dos intermediários nas taxas necessárias para manter a célula em um estado de equilíbrio estável enquanto evita o desperdício de uma superprodução. O fluxo de átomos de carbono que entram no ciclo do ácido cítrico a partir do piruvato, e também durante o curso do ciclo, está sob constante regulação em dois níveis: a conversão de piruvato a acetil-CoA, o material de partida do ciclo (a reação da piruvato-desidrogenase), e a entrada da acetil-CoA no ciclo (a reação

da citrato-sintase). A acetil-CoA também é produzida por outras vias que não a reação do complexo da PDH – a maioria das células produz acetil-CoA pela oxidação de ácidos graxos e certos aminoácidos – e a disponibilidade de intermediários a partir dessas vias é importante para a regulação da oxidação do piruvato e do ciclo do ácido cítrico. O ciclo também é regulado nas reações da isocitrato-desidrogenase e da  $\alpha$ -cetogluturato-desidrogenase.

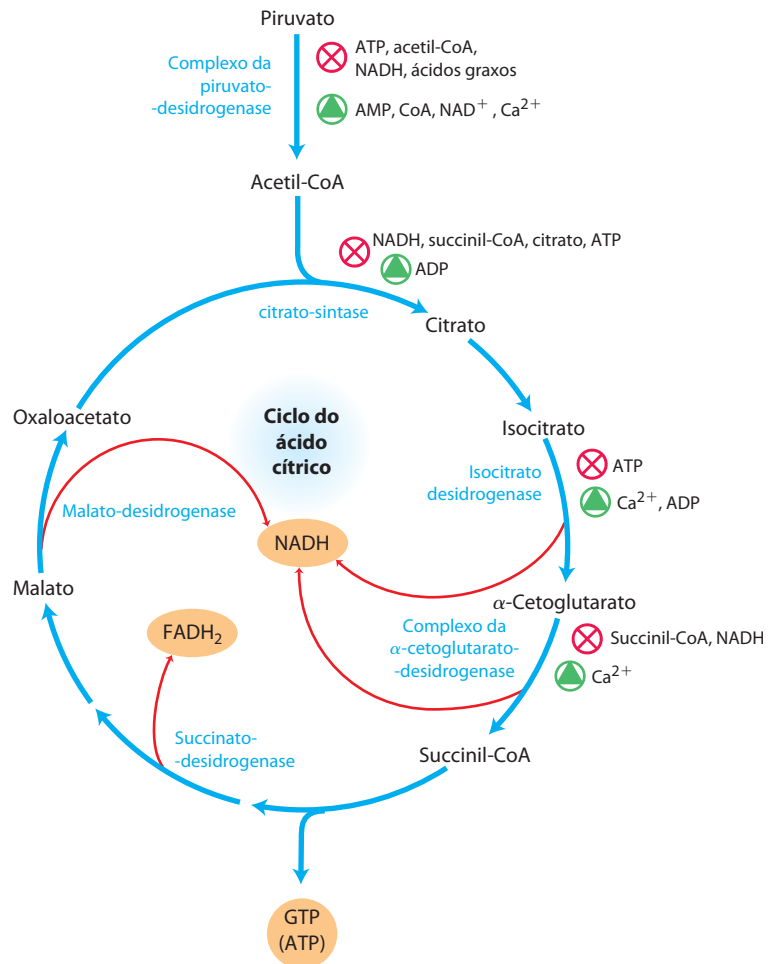
### A produção de acetil-CoA pelo complexo piruvato-desidrogenase é regulada por mecanismos alostéricos e covalentes

O complexo da PDH de mamíferos é fortemente inibido por ATP e por acetil-CoA e NADH, os produtos da reação catalisada pelo complexo (Figura 16-19). A inibição alostérica da oxidação do piruvato é muito aumentada quando ácidos graxos de cadeia longa estão disponíveis. AMP, CoA e  $NAD^+$  se acumulam quando muito pouco acetato flui para dentro do ciclo, ativando alostericamente o complexo da PDH. Portanto, essa enzima é desativada quando o combustível está disponível em grande quantidade, na forma de ácidos graxos e acetil-CoA, e quando as razões celulares  $[ATP]/[ADP]$

$[ADP]$  e  $[NADH]/[NAD^+]$  estão elevadas, e a enzima é ativada novamente quando a demanda de energia está alta e a célula necessita de um maior fluxo de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico.

Em mamíferos, esses mecanismos de regulação alostéricos são complementados por um segundo nível de regulação: a modificação covalente das proteínas. O complexo da PDH é inibido pela fosforilação reversível de um resíduo de Ser específico em uma das duas subunidades  $E_1$ . Como mencionado anteriormente, além das enzimas  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$ , o complexo da PDH de mamíferos contém duas proteínas de regulação, cujo único propósito é regular a atividade do complexo. A piruvato-desidrogenase-quinase fosforila e, dessa maneira, inativa  $E_1$ , enquanto uma fosfoproteína-fosfatase específica remove o grupo fosfato por hidrólise e, desta maneira, ativa  $E_1$ . A cinase é alostericamente ativada por ATP: quando a  $[ATP]$  está elevada (refletindo um suprimento de energia adequado), o complexo da PDH é inativado pela fosforilação de  $E_1$ . Quando  $[ATP]$  diminui, a atividade da cinase diminui e a ação da fosfatase remove o grupo fosfato de  $E_1$ , ativando o complexo.

O complexo da PDH de plantas, localizado na matriz mitocondrial e em plastídeos, é inibido por seus produtos,



**FIGURA 16-19** Regulação do fluxo dos metabólitos a partir do complexo da PDH durante o ciclo do ácido cítrico em mamíferos. O complexo da PDH é alostericamente inibido quando as razões  $[ATP]/[ADP]$ ,  $[NADH]/[NAD^+]$  e  $[acetil-CoA]/[CoA]$  estão elevadas, indicando um estado metabólico com energia suficiente. Quando estas razões decrescem, o resultado é a ativação alostérica da oxidação do piruvato. A velocidade do fluxo pelo ciclo do ácido cítrico pode ser limitada pela disponibilidade dos substratos da citrato-sintase, oxaloacetato e acetil-CoA, ou de  $NAD^+$ , o qual é exaurido pela conversão a NADH, retardando as três etapas de oxidação dependentes de NAD. A inibição por retroalimentação por succinil-CoA, citrato e ATP também diminui a velocidade do ciclo pela inibição de etapas iniciais. No tecido muscular, o  $Ca^{2+}$  estimula a contração e, como mostrado aqui, estimula o metabolismo gerador de energia para repor o ATP consumido durante a contração.

NADH e acetil-CoA. A enzima mitocondrial vegetal também é regulada pela fosforilação reversível; o piruvato inibe a cinase, ativando o complexo da PDH, e  $\text{NH}_4^+$  estimula a cinase, causando a inativação do complexo. O complexo da PDH de *E. coli* está sob regulação alostérica similar àquela da enzima de mamíferos, mas não parece ser regulado por fosforilação.

### O ciclo do ácido cítrico é regulado nas três etapas exergônicas

O fluxo de metabólitos durante o curso do ciclo do ácido cítrico é mantido sob regulação rigorosa. Três fatores controlam a velocidade do fluxo no ciclo: disponibilidade de substrato, inibição pelos produtos acumulados e inibição alostérica por retroalimentação das enzimas que catalisam as etapas iniciais do ciclo.

Cada uma das três etapas fortemente exergônicas do ciclo – aquelas catalisadas por citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase (Figura 16-19) – podem tornar-se a etapa limitante da velocidade sob algumas circunstâncias. A disponibilidade dos substratos da citrato-sintase (acetil-CoA e oxaloacetato) varia com o estado metabólico da célula e, às vezes, limita a taxa de formação de citrato. O NADH, produto da oxidação do citrato e do  $\alpha$ -cetoglutarato, acumula-se sob determinadas condições, e em alta  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  ambas as reações de desidrogenação são fortemente inibidas pela ação das massas. Na célula, de maneira similar, a reação da malato-desidrogenase está essencialmente em equilíbrio (ou seja, é limitada pelo substrato), e quando a  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  está alta, a concentração de oxaloacetato está baixa, desacelerando a primeira etapa do ciclo. O acúmulo de produto inibe as três etapas limitantes do ciclo: a succinil-CoA inibe a  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase (e também a citrato-sintase); o citrato bloqueia a citrato-sintase; e o produto final, ATP, inibe a citrato-sintase e a isocitrato-desidrogenase. A inibição da citrato-sintase pelo ATP é abrandada por ADP, um ativador alostérico dessa enzima. Nos músculos dos vertebrados,  $\text{Ca}^{2+}$ , o sinalizador para a contração e o aumento concomitante na demanda de ATP, ativa a isocitrato-desidrogenase e a  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase, assim como ativa o complexo da PDH. Dessa forma, as concentrações dos substratos e dos intermediários do ciclo do ácido cítrico ajustam o fluxo dessa via para a velocidade que forneça as concentrações ótimas de ATP e NADH.

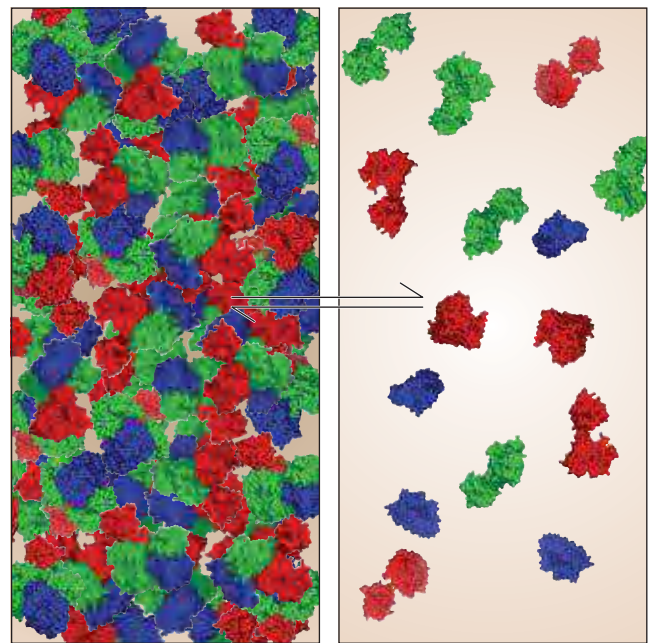
Sob condições normais, as velocidades da glicólise e do ciclo do ácido cítrico estão integradas de modo que a quantidade de glicose metabolizada a piruvato seja exatamente a quantidade suficiente para suprir o ciclo do ácido cítrico com o seu combustível, os grupos acetil da acetil-CoA. Piruvato, lactato e acetil-CoA normalmente são mantidos nas concentrações do estado estacionário. A velocidade da glicólise é vinculada à velocidade do ciclo do ácido cítrico não apenas por meio da inibição pelos altos níveis de ATP e NADH, os quais são comuns a ambos os estágios da oxidação da glicose, a via glicolítica e a respiração, mas também é regulada pela concentração de citrato. Citrato, o produto

da primeira etapa do ciclo do ácido cítrico, é um importante inibidor alostérico da fosfofrutocinase-1 na via glicolítica (ver Figura 15-16).

### A canalização do substrato em complexos multienzimáticos pode ocorrer durante o ciclo do ácido cítrico

Embora as enzimas do ciclo do ácido cítrico normalmente sejam descritas como componentes solúveis da matriz mitocondrial (exceto pela succinato-desidrogenase, que é ligada à membrana), evidências crescentes sugerem que, dentro da mitocôndria, essas enzimas existem como complexos multienzimáticos. A abordagem clássica da enzimologia – a purificação de proteínas isoladas a partir de extratos de células lisadas – foi utilizada com grande sucesso para as enzimas do ciclo do ácido cítrico. Entretanto, a primeira “vítima” da lise celular é o alto nível de organização da célula – as interações não covalentes e reversíveis de uma proteína com a outra, ou entre enzimas e algum componente estrutural, como membranas, microtúbulos ou microfilamentos. Quando as células são rompidas, seus conteúdos, incluindo enzimas, são diluídos 100 ou 1.000 vezes (Figura 16-20).

Vários tipos de evidências sugerem que, nas células, os complexos multienzimáticos asseguram a passagem




No citosol, altas concentrações das enzimas 1, 2 e 3 favorecem sua associação.

Em um extrato de células lisadas, a diluição com solução tampão reduz as concentrações das enzimas 1, 2 e 3, favorecendo sua dissociação.

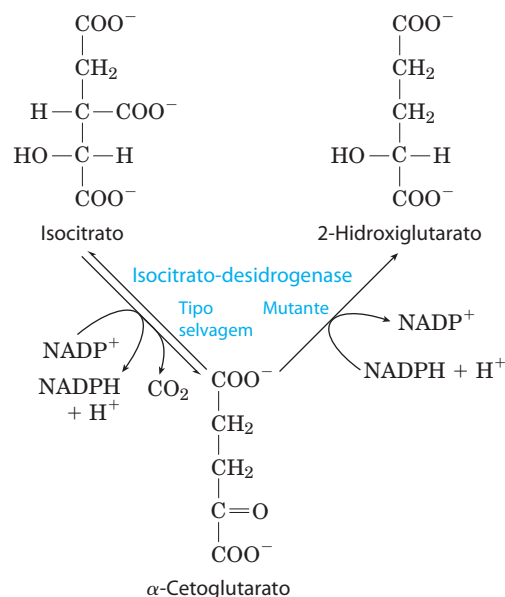
**FIGURA 16-20** A diluição de uma solução contendo um complexo proteico não ligado covalentemente – como um constituído por três enzimas (ilustradas aqui em vermelho, azul e verde) – favorece a dissociação do complexo em seus constituintes.

eficiente do produto de uma reação enzimática para a próxima enzima da via. Tais complexos são chamados de **metabolons**. Certas enzimas do ciclo do ácido cítrico têm sido isoladas em conjunto como complexos supramoleculares, ou têm sido encontradas em associação com a membrana mitocondrial interna, ou se difundem na matriz mitocondrial mais lentamente do que o esperado para proteínas isoladas em solução. Existem fortes evidências da canalização de substratos por complexos multienzimáticos em outras vias metabólicas, e muitas enzimas consideradas “solúveis” provavelmente atuam na célula em complexos altamente organizados que canalizam intermediários. Outros exemplos de canalização serão fornecidos na discussão da biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos, no Capítulo 22.

### Algumas mutações em enzimas do ciclo do ácido cítrico levam ao desenvolvimento de câncer

 Quando os mecanismos da regulação de uma via como o ciclo do ácido cítrico são afetados por uma perturbação metabólica importante, o resultado pode ser uma doença grave. São raríssimas as mutações nas enzimas do ciclo do ácido cítrico em humanos e outros mamíferos, mas quando ocorrem são devastadoras. Defeitos genéticos no gene da fumarase levam a tumores no músculo liso (leiomas) e nos rins; mutações na succinato-desidrogenase levam a tumores da glândula suprarrenal (feocromocitomas). Nas células em cultura com essas mutações, o fumarato (no caso das mutações na fumarase) e, em menor extensão, o succinato (no caso das mutações na succinato-desidrogenase) acumulam-se, e esse acúmulo induz a expressão do fator de transcrição induzível por hipóxia HIF-1 $\alpha$  (HIF, de *hipoxia-inducible transcription factor*) (ver Quadro 14-1). O mecanismo que leva à formação do tumor pode ser a geração de um estado de pseudo-hipoxia. Nas células com essas mutações, ocorre maior expressão dos genes normalmente regulados por HIF-1 $\alpha$ . Esses efeitos das mutações nos genes da fumarase e da succinato-desidrogenase os definem como genes supressores de tumor (p. 489).

Outra conexão marcante entre os intermediários do ciclo do ácido cítrico e câncer é a descoberta que, em muitos tumores das células da glia (gliomas), a isocitrato-desidrogenase dependente de NADPH apresenta um defeito genético incomum. A enzima mutante perde sua atividade normal (converte isocitrato a  $\alpha$ -cetogluturato), mas *ganha* uma nova atividade: ela converte  $\alpha$ -cetogluturato a 2-hidroxi-glutarato (**Figura 16-21**), que acumula nas células tumorais.  $\alpha$ -Cetogluturato e Fe<sup>3+</sup> são cofatores essenciais para uma família de histonas-desmetilases que alteram a expressão gênica por meio da remoção de grupos metil de resíduos de Arg e Lys nas histonas que organizam o DNA nuclear. Por competir com o  $\alpha$ -cetogluturato pela ligação às histonas-desmetilases, o 2-hidroxi-glutarato inibe a atividade dessas enzimas. A inibição das histonas-desmetilases, por sua vez, interfere com a regulação gênica normal, levando ao crescimento descontrolado das células da glia. ■



**FIGURA 16-21 Uma isocitrato-desidrogenase mutante adquire uma nova função.** A isocitrato-desidrogenase do tipo selvagem catalisa a conversão de isocitrato a  $\alpha$ -cetogluturato, porém mutações que alteram o sítio de ligação do isocitrato levam a perda da função da atividade enzimática normal e ao ganho de uma nova atividade: conversão de  $\alpha$ -cetogluturato a 2-hidroxi-glutarato. O acúmulo deste produto inibe a histona-desmetilase, alterando a regulação gênica e levando a tumores das células gliares no cérebro.

### RESUMO 16.3 Regulação do ciclo do ácido cítrico

- ▶ A velocidade global do ciclo do ácido cítrico é controlada pela taxa de conversão do piruvato a acetil-CoA e pelo fluxo pelas enzimas citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e  $\alpha$ -cetogluturato-desidrogenase. Esses fluxos são determinados pelas concentrações dos substratos e dos produtos: os produtos finais ATP e NADH são inibidores, e os substratos NAD<sup>+</sup> e ADP são estimuladores.
- ▶ A produção de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico pelo complexo da PDH é inibida alostericamente pelos metabólitos que sinalizam a suficiência de energia metabólica (ATP, acetil-CoA, NADH e ácidos graxos), sendo estimulada pelos metabólitos que indicam um suprimento de energia reduzido (AMP, NAD<sup>+</sup>, CoA).
- ▶ Os complexos formados por enzimas em sequência em uma via possibilitam a canalização do substrato entre essas enzimas.

## 16.4 Ciclo do glioxilato

Os vertebrados não conseguem converter ácidos graxos, ou o acetato derivado deles, a carboidratos. As conversões de fosfoenolpiruvato a piruvato (p. 554) e de piruvato a acetil-CoA (Figura 16-2) de tão exergônicas são essencialmente irreversíveis. Se uma célula não consegue converter acetato a fosfoenolpiruvato, o acetato não pode ser o material de partida para a via gliconeogênica, que leva de fosfoenolpiruvato a glicose (ver Figura 15-13). Sem essa capacidade,



portanto, uma célula ou organismo é incapaz de converter combustíveis ou metabólitos que são degradados a acetato (ácidos graxos e certos aminoácidos) em carboidratos.

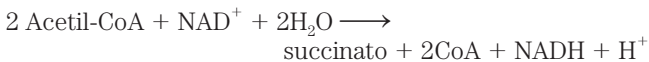
Como mencionado na discussão sobre reações anapleróticas (Tabela 16-2), o fosfoenolpiruvato pode ser sintetizado a partir de oxaloacetato em uma reação reversível catalisada pela PEP-carboxicinas:



Como os átomos de carbono das moléculas de acetato que entram no ciclo do ácido cítrico aparecem oito etapas depois no oxaloacetato, pode parecer que esta via pode produzir oxaloacetato a partir de acetato e, assim, originar fosfoenolpiruvato para a gliconeogênese. Contudo, como mostrado por um exame da estequiometria do ciclo do ácido cítrico, não há conversão líquida de acetato a oxaloacetato; nos vertebrados, para cada dois carbonos que entram no ciclo na forma de acetil-CoA, dois são liberados na forma de  $\text{CO}_2$ . Em muitos organismos que não os vertebrados, o ciclo do glioxilato funciona como mecanismo para a conversão de acetato a carboidratos.

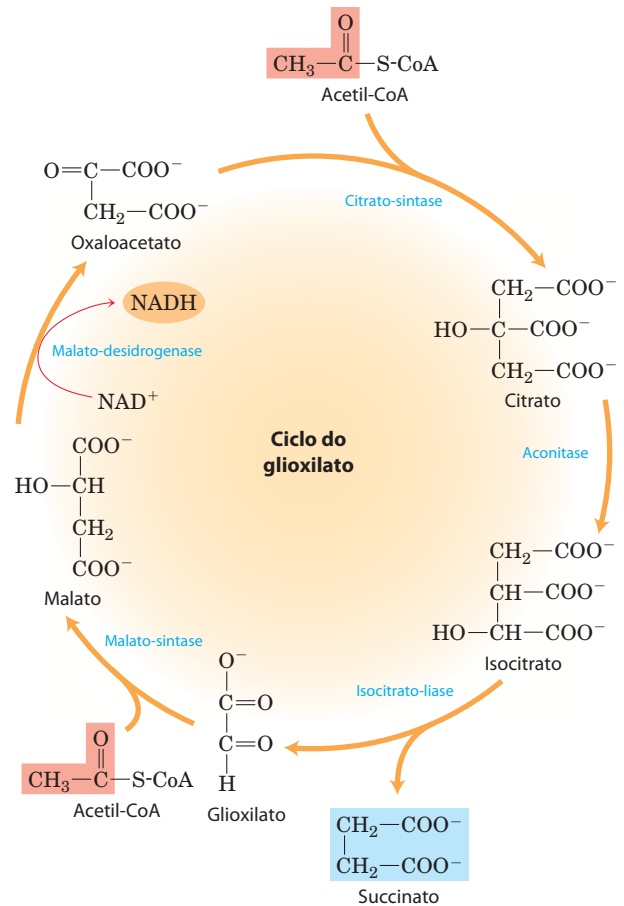
### O ciclo do glioxilato produz compostos de quatro carbonos a partir de acetato

Em plantas, certos invertebrados e alguns microrganismos (incluindo *E. coli* e levedura), o acetato pode ser tanto um combustível rico em energia como uma fonte de fosfoenolpiruvato para a síntese de carboidratos. Nesses organismos, as enzimas do **ciclo do glioxilato** catalisam a conversão líquida de acetato a succinato ou outros intermediários de quatro carbonos do ciclo do ácido cítrico:



No ciclo do glioxilato, a acetil-CoA é condensada com o oxaloacetato para formar citrato, e o citrato é convertido a isocitrato, exatamente como no ciclo do ácido cítrico. A próxima etapa, porém, não é a quebra do isocitrato pela isocitrato-desidrogenase, mas a clivagem do isocitrato pela **isocitrato-liase**, formando succinato e **glioxilato**. O glioxilato, então, é condensado com uma segunda molécula de acetil-CoA para a geração de malato, em uma reação catalisada pela **malato-sintase**. O malato é posteriormente oxidado a oxaloacetato, o qual pode ser condensado com outra molécula de acetil-CoA para iniciar outra volta do ciclo (Figura 16-22). Cada volta do ciclo do glioxilato consome duas moléculas de acetil-CoA e produz uma molécula de succinato, que está, então, disponível aos propósitos biossintéticos. O succinato pode ser convertido via fumarato e malato a oxaloacetato, o qual pode, então, ser convertido a fosfoenolpiruvato pela PEP-carboxicinas, e, assim, a glicose pela gliconeogênese. Os vertebrados não têm as enzimas específicas do ciclo do glioxilato (isocitrato-liase e malato-sintase) e, portanto, não conseguem realizar a síntese líquida de glicose a partir de lipídeos.

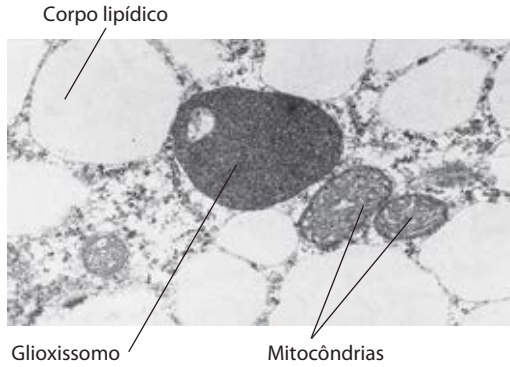
Em plantas, as enzimas do ciclo do glioxilato estão sequestradas em organelas delimitadas por membrana cha-



**FIGURA 16-22** Ciclo do glioxilato. A citrato-sintase, a aconitase e a malato-desidrogenase do ciclo do glioxilato são isoenzimas das enzimas do ciclo do ácido cítrico; isocitrato-liase e malato-sintase são exclusivas do ciclo do glioxilato. Observe que dois grupos acetil (em cor salmão) entram no ciclo e quatro carbonos saem na forma de succinato (em azul). O ciclo do glioxilato foi elucidado por Hans Kornberg e Neil Madsen no laboratório de Hans Krebs.

madas de glioxissomos, os quais são peroxissomos especializados (Figura 16-23). As enzimas comuns ao ciclo do ácido cítrico e do glioxilato têm duas isoenzimas, uma específica das mitocôndrias, outra específica dos glioxissomos. Os glioxissomos nem sempre estão presentes em todos os tecidos vegetais. Eles se desenvolvem nas sementes ricas em lipídeos durante a germinação, antes de a planta adquirir a capacidade de produzir glicose pela fotossíntese. Além das enzimas do ciclo do glioxilato, os glioxissomos contêm todas as enzimas necessárias para a degradação dos ácidos graxos estocados nos óleos das sementes (ver Figura 17-14). A acetil-CoA formada pela degradação dos lipídeos é convertida a succinato, via ciclo do glioxilato, e o succinato é exportado para a mitocôndria, onde as enzimas do ciclo do ácido cítrico o transformam em malato. Uma isoenzima citosólica da malato-desidrogenase oxida malato a oxaloacetato, um precursor para a gliconeogênese. As sementes em germinação podem, assim, converter em glicose os carbonos dos lipídeos estocados.





**FIGURA 16-23** Micrografia eletrônica de uma semente de pepino em germinação, mostrando glioxissomo, mitocôndrias e corpos lipídicos circundantes.

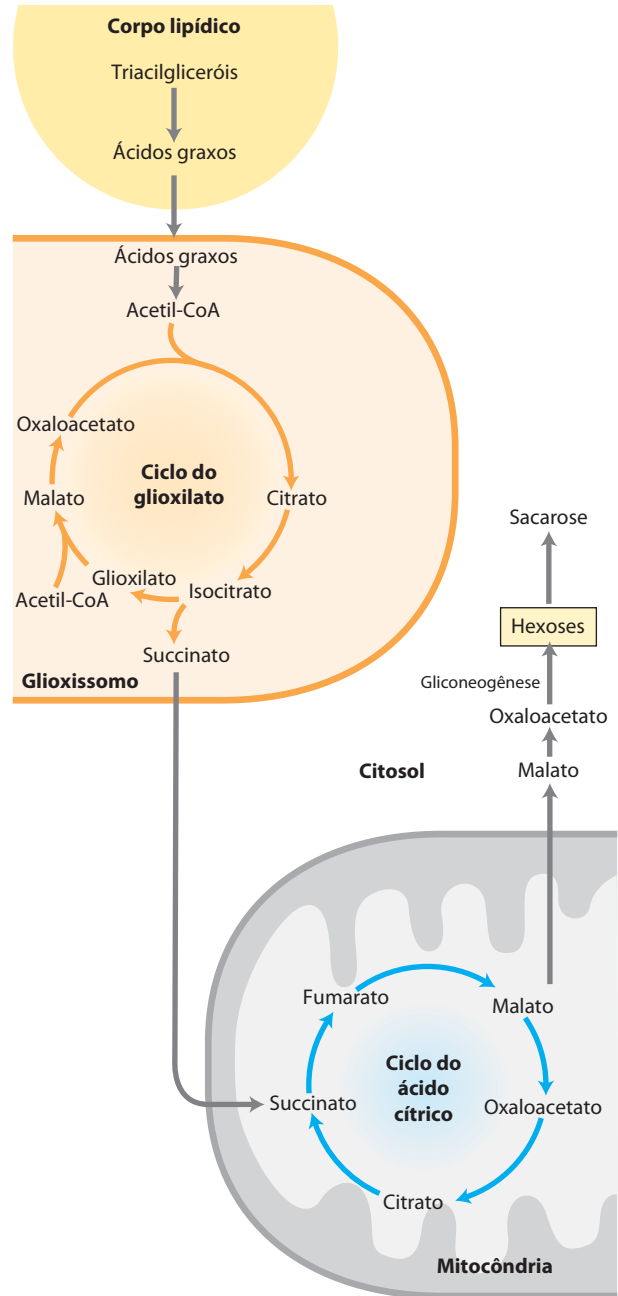
**Os ciclos do ácido cítrico e do glioxilato são regulados coordenadamente**

Nas sementes em germinação, as transformações enzimáticas dos ácidos dicarboxílico e tricarboxílico ocorrem em três compartimentos intracelulares: mitocôndrias, glioxissomos e citosol. Existe um constante intercâmbio de metabólitos entre esses compartimentos (Figura 16-24).

O esqueleto de carbono do oxaloacetato originado pelo ciclo do ácido cítrico (na mitocôndria) é transportado ao glioxissomo na forma de aspartato. O aspartato é convertido a oxaloacetato, que se condensa com a acetil-CoA derivada da degradação dos ácidos graxos. O citrato assim formado é convertido a isocitrato pela aconitase, sendo então dividido em glioxilato e succinato pela isocitrato-liase. O succinato retorna à mitocôndria, entra novamente no ciclo do ácido cítrico e é transformado em malato, que vai para o citosol e é oxidado (pela malato-desidrogenase citosólica) a oxaloacetato. O oxaloacetato é convertido, via gliconeogênese, a hexoses e sacarose, as quais podem ser transportadas às raízes e aos brotos em crescimento. Quatro vias distintas participam destas conversões: degradação dos ácidos graxos a acetil-CoA (nos glioxissomos), ciclo do glioxilato (nos glioxissomos), ciclo do ácido cítrico (nas mitocôndrias) e gliconeogênese (no citosol).

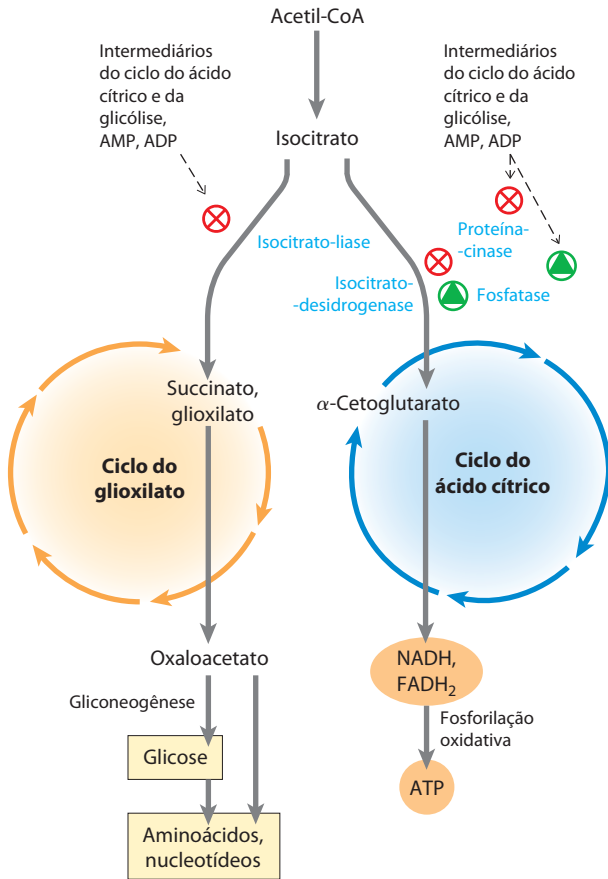
O compartilhamento de intermediários comuns requer que essas vias sejam reguladas de forma coordenada. O isocitrato é um intermediário crucial, no ponto de ramificação entre os ciclos do glioxilato e do ácido cítrico (Figura 16-25). A isocitrato-desidrogenase é regulada por modificação covalente: uma proteína-cinase específica fosforila, e assim inativa a desidrogenase. Essa inativação desvia isocitrato para o ciclo do glioxilato, onde ele inicia a via sintética para a produção de glicose. Uma fosfoproteína-fosfatase remove o grupo fosfato da isocitrato-desidrogenase, reativando a enzima e lançando mais isocitrato para geração de energia pelo ciclo do ácido cítrico. As atividades cinásica e fosfatásica de regulação são atividades enzimáticas separadas de um único polipeptídeo.

Algumas bactérias, incluindo *E. coli*, têm o conjunto completo de enzimas para o ciclos do glioxilato e do áci-



**FIGURA 16-24** Relações entre os ciclos do glioxilato e do ácido cítrico. As reações do ciclo do glioxilato (nos glioxissomos) acontecem simultaneamente, entrelaçando-se com as reações do ciclo do ácido cítrico (nas mitocôndrias), conforme os intermediários passam por estes compartimentos. A conversão de succinato a oxaloacetato é catalisada pelas enzimas do ciclo do ácido cítrico. A oxidação de ácidos graxos a acetil-CoA está descrita no Capítulo 17; a síntese de hexoses a partir de oxaloacetato está descrita no Capítulo 20.

do cítrico no citosol, podendo, portanto, crescer utilizando acetato como única fonte de carbono e energia. A fosfoproteína-fosfatase que ativa a isocitrato-desidrogenase é estimulada por intermediários do ciclo do ácido cítrico e da glicólise, sendo inibida pelos indicadores de suprimento



**FIGURA 16-25** Regulação coordenada dos ciclos do glioxilato e do ácido cítrico. A regulação da atividade da isocitrato-desidrogenase determina o participação alternada do isocitrato entre os ciclos do glioxilato e do ácido cítrico. Quando a enzima está inativada por fosforilação (por uma proteína-cinase específica), o isocitrato é direcionado para reações biossintéticas, via ciclo do glioxilato. Quando a enzima é ativada por desfosforilação (por uma fosfatase específica), o isocitrato entra no ciclo do ácido cítrico e ATP é produzido.

reduzido de energia (Figura 16-25). Os mesmos metabólitos *inibem* a atividade cinásica do polipeptídeo bifuncional. Desse modo, o acúmulo de intermediários das principais vias de produção de energia – indicando o esgotamento de energia – resulta na ativação da isocitrato-desidrogenase. Quando a concentração desses reguladores diminui, sinalizando um fluxo suficiente para a produção de energia pelo ciclo do ácido cítrico, a isocitrato-desidrogenase é inativada pela proteína-cinase.

Os mesmos intermediários da glicólise e do ciclo do ácido cítrico que ativam a isocitrato-desidrogenase são inibidores alóstericos da isocitrato-liase. Quando o metabolismo gerador de energia está suficientemente rápido e mantém baixas as concentrações dos intermediários glicolíticos e do ciclo do ácido cítrico, a isocitrato-desidrogenase é inativada, a inibição da isocitrato-liase é abrandada e o isocitrato flui para a via do glioxilato, para ser utilizado na biossíntese de carboidratos, aminoácidos e outros componentes celulares.

**RESUMO 16.4** Ciclo do glioxilato

- ▶ O ciclo do glioxilato está ativo nas sementes em germinação de algumas plantas e em certos microrganismos que conseguem viver utilizando acetato como a única fonte de carbono. Nas plantas, essa via ocorre nos glio-xissomos dos brotos. Ela inclui algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico e duas enzimas adicionais: isocitrato-liase e malato-sintase.
- ▶ No ciclo do glioxilato, o desvio das duas etapas de descarboxilação do ciclo do ácido cítrico torna possível a formação líquida de succinato, oxaloacetato e outros intermediários do ciclo do ácido cítrico a partir de acetil-CoA. O oxaloacetato formado deste modo pode ser utilizado para a síntese de glicose via gliconeogênese.
- ▶ Os vertebrados carecem das enzimas do ciclo do glio-xilato e não conseguem sintetizar glicose a partir do acetato ou dos ácidos graxos que dão origem à acetil-CoA.
- ▶ A participação alternada do isocitrato do ciclo do ácido cítrico e do ciclo do glioxilato é controlada no nível da isocitrato-desidrogenase, a qual é regulada por fosforilação reversível.

**Termos-chave**

Os termos em **negrito** estão definidos no glossário.

<b>respiração</b> 633	complexo da $\alpha$ -cetogluturato-
respiração celular 633	desidrogenase 644
<b>ciclo do ácido cítrico</b> 633	<b>nucleosídeo-difosfato-</b>
<b>ciclo do ácido</b>	<b>-cinase</b> 645
<b>tricarboxílico</b>	<b>sintases</b> 646
<b>(TCA)</b> 633	<b>sintetases</b> 646
<b>ciclo de Krebs</b> 633	<b>ligases</b> 646
complexo da piruvato-	<b>liases</b> 646
desidrogenase (PDH)	<b>cinases</b> 646
634	<b>fosforilases</b> 646
descarboxilação oxidati-	<b>fosfatases</b> 646
va 634	<b>molécula pró-quiral</b> 648
<b>tioéster</b> 635	<b>via anfibólica</b> 650
<b>lipoato</b> 635	<b>reação anaplerótica</b> 650
<b>canalização do substrato</b>	<b>biotina</b> 651
637	avidina 653
<b>centro de ferro-enxofre</b>	<b>metabolon</b> 656
641	<b>ciclo do glioxilato</b> 657
<b>moonlighting</b> 642	

**Leituras adicionais**

**Geral**

**Holmes, F.L.** (1990, 1993) *Hans Krebs*, Vol 1: *Formation of a Scientific Life, 1900–1933*; Vol. 2: *Architect of Intermediary Metabolism, 1933–1937*, Oxford University Press, Oxford.  
 Biografia da trajetória científica e pessoal de Krebs, escrita por um célebre historiador da ciência, com a descrição completa do trabalho que revelou os ciclos da ureia e do ácido cítrico.

**Kay, J. & Weitzman, P.D.J. (eds).** (1987) *Krebs' Citric Acid Cycle: Half a Century and Still Turning*, Biochemical Society Symposium **54**, The Biochemical Society, London.

Livro com múltiplos autores sobre o ciclo do ácido cítrico, incluindo genética molecular, mecanismos de regulação, variações do ciclo em microrganismos de nichos ecológicos incomuns e evolução da via. Especialmente relevantes são os capítulos de H. Gest (As raízes evolutivas do ciclo do ácido cítrico em procaríotos) W.H. Holms (Controle do fluxo por meio do ciclo do ácido cítrico e o desvio do glioxilato em *Escherichia coli*) e R.N. Perham et al. (Complexos da  $\alpha$ -cetoácido-desidrogenases).

### Complexo da piruvato-desidrogenase

**Harris, R.A., Bowker-Kinley, M.M., Huang, B., & Wu, P.** (2002) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv. Enzyme Regul.* **42**, 249–259.

**Milne, J.L.S., Shi, D., Rosenthal, P.B., Sunshine, J.S., Domingo, G.J., Wu, X., Brooks, B.R., Perham, R.N., Henderson, R., & Subramaniam, S.** (2002) Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *EMBO J.* **21**, 5587–5598.

Bela ilustração do poder da metodologia para a reconstrução de imagens aliada à microscopia crioeletrônica, aqui utilizada para desenvolver um modelo plausível da estrutura do complexo da PDH. Compare este modelo com aquele no artigo de Zhou et al. (a seguir).

**Perham, R.N.** (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 961–1004.

Revisão sobre o papel dos braços flexíveis contendo lipoato, biotina e pantotenato na canalização do substrato em complexos multienzimáticos.

**Zhou, Z.H., McCarthy, D.B., O'Conner, C.M., Reed, L.J., & Stoops, J.K.** (2001) The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14,802–14,807.

Outro artigo impressionante no qual a reconstrução de imagens e a microscopia crioeletrônica originam um modelo para o complexo da PDH. Compare este modelo com aquele no artigo de Milne et al. (anteriormente).

### Enzimas do ciclo do ácido cítrico

**de la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., & Herrera-Estrella, L.** (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**, 1566–1568.

**Fraser, M.D., James, M.N., Bridger, W.A., & Wolodko, W.T.** (1999) A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J. Mol. Biol.* **285**, 1633–1653. (Veja também a errata em *J. Mol. Biol.* **288**, 501 [1998].)

**Goward, C.R. & Nicholls, D.J.** (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.* **3**, 1883–1888.

Uma curta e boa revisão.

**Hagerhall, C.** (1997) Succinate: quinone oxidoreductases: variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 107–141.

Uma revisão sobre a estrutura e a função das succinato-desidrogenases.

**Hanson, R.W.** (2009) Thematic minireview series: a perspective on the biology of phosphoenolpyruvate carboxykinase 55 years after its discovery. *J. Biol. Chem.* **284**, 27,021–27,023.

Introdução editorial a uma série de revisões curtas sobre a PEP-carboxicinas neste exemplar da revista.

**Jitrapakdee, S., St. Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C., & Attwood, P.V.** (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **413**, 369–387.

**Ma, J.F., Ryan, P.R., & Delhaize, E.** (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* **6**, 273–278.

**Matte, A., Tari, L.W., Goldie, H., & Delbaere, L.T.J.** (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105–8108.

**Ovadi, J. & Srere, P.** (2000) Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* **192**, 255–280.

Aprofundada revisão sobre as evidências em canalização e metabolons.

**Prensner, J.R. & Chinnaiyan, A.M.** (2011) Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat. Med.* **17**, 291–293.

Sucinta revisão sobre as mutações da isocitrato-desidrogenase associadas com câncer.

**Remington, S.J.** (1992) Structure and mechanism of citrate synthase. *Curr. Top. Cell. Regul.* **33**, 209–229.

Completa revisão sobre a enzima citrato-sintase.

**Singer, T.P. & Johnson, M.K.** (1985) The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification. *FEBS Lett.* **190**, 189–198.

Descrição da estrutura e da função dos centros de ferro-enxofre na succinato-desidrogenase.

**Weigand, G. & Remington, S.J.** (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**, 97–117.

**Wolodko, W.T., Fraser, M.E., James, M.N.G., & Bridger, W.A.** (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 10,883–10,890.

**Yang, J., Kalhan, S.C., & Hanson, R.W.** (2009) What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J. Biol. Chem.* **284**, 27,025–27,029.

Breve revisão sobre as diversas funções desta enzima.

### Enzimas com mais de uma função

**Eisenstein, R.S.** (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 627–662.

**Flores, C.-L. & Gancedo, C.** (2011) Unraveling moonlighting functions with yeasts. *IUBMB Life* **63**, 457–462.

**Jeffery, C.J.** (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11.

**Kim, J.-W. & Dang, C.V.** (2006) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 142–150.

Revisão em nível intermediário sobre as enzimas com mais de uma função.

**Rouault, T.A.** (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 406–414.

Revisão avançada.

### Regulação do ciclo do ácido cítrico

**Briere, J.-J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Rustin, P.** (2006) Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, 1114–1120.

Revisão em nível intermediário sobre os efeitos clínicos das mutações na succinato-desidrogenase, na fumarase e na  $\alpha$ -cetoglutatarato-desidrogenase.

**Hansford, R.G.** (1980) Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr. Top. Bioenerget.* **10**, 217–278.

Detalhada revisão sobre a regulação do ciclo do ácido cítrico.

**Kaplan, N.O.** (1985) The role of pyridine nucleotides in regulating cellular metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **26**, 371–381.

Excelente discussão geral sobre a importância da razão [NADH]/[NAD<sup>+</sup>] na regulação celular.

**King, A., Selak, M.A., & Gottlieb, E.** (2006) Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* **25**, 4675–4682.

**Reed, L.J., Damuni, Z., & Merryfield, M.L.** (1985) Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**, 41–49.

## Ciclo do glioxilato

**Eastmond, P.J. & Graham, I.A.** (2001) Reexamining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* **6**, 72–77.

Revisão em nível intermediário sobre os estudos do ciclo do glioxilato em *Arabidopsis*.

**Holms, W.H.** (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 69–106.

## Problemas

**1. O balancete do ciclo do ácido cítrico.** O ciclo do ácido cítrico tem oito enzimas: citrato-sintase, aconitase, isocitrato-desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase, succinil-CoA-sintetase, succinato-desidrogenase, fumarase e malato-desidrogenase.

(a) Escreva uma equação equilibrada para a reação catalisada por cada enzima.

(b) Identifique o(s) cofator(es) necessário(s) para cada reação enzimática.

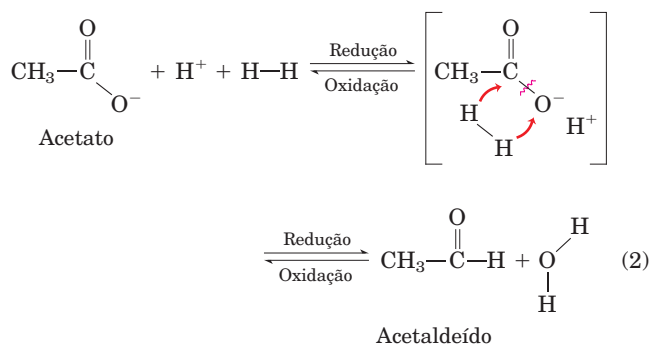
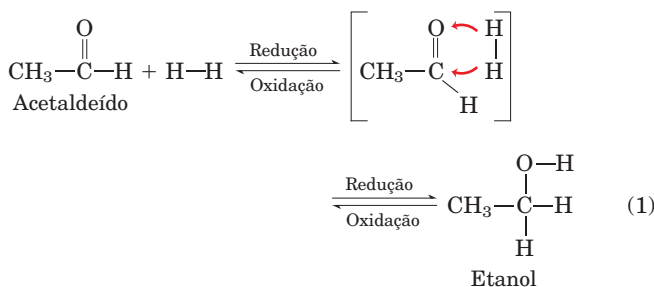
(c) Para cada enzima, determine qual dos seguintes descreve o tipo de reação(ões) catalisada(s): condensação (formação de ligação carbono-carbono); desidratação (perda de água); hidratação (adição de água); descarboxilação (perda de  $\text{CO}_2$ ); oxidação-redução; fosforilação em nível de substrato; isomerização.

(d) Escreva uma reação líquida equilibrada para o catabolismo de acetil-CoA a  $\text{CO}_2$ .

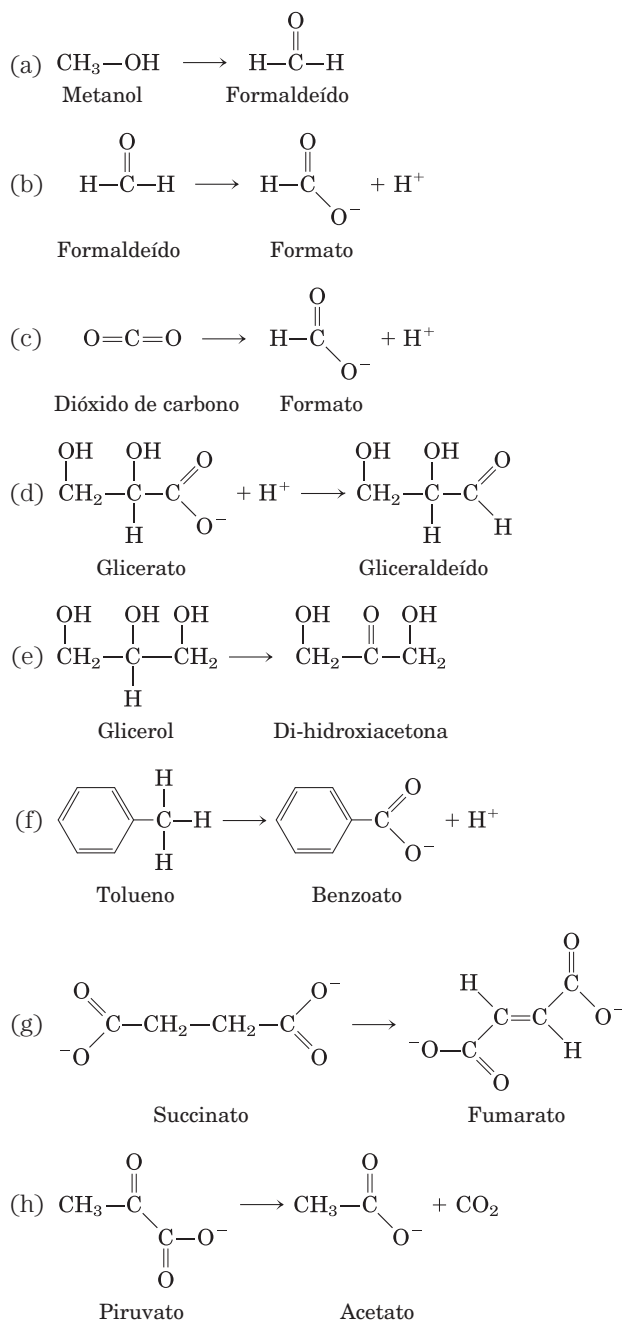
**2. Equação líquida da glicólise e do ciclo do ácido cítrico.** Escreva a equação bioquímica líquida do metabolismo de uma molécula de glicose pela glicólise e pelo ciclo do ácido cítrico, incluindo todos os cofatores.

**3. A identificação das reações de oxidação e redução.**

Uma estratégia bioquímica de muitos organismos vivos é a oxidação gradual de compostos orgânicos a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  e a conservação da maior parte da energia assim produzida na forma de ATP. É importante ser capaz de reconhecer os processos de oxidação e redução do metabolismo. A redução de uma molécula orgânica é o resultado da hidrogenação de uma ligação dupla (Equação 1, abaixo) ou de uma ligação simples com clivagem concomitante (Equação 2). Por outro lado, a oxidação é o resultado da desidrogenação. Nas reações bioquímicas redox, as coenzimas NAD e FAD desidrogenam/hidrogenam moléculas orgânicas na presença das enzimas apropriadas.



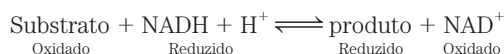
Para cada uma das transformações metabólicas de (a) a (h), determine se ocorreu uma oxidação ou uma redução. Equilibre cada transformação pela inserção de  $\text{H}-\text{H}$  e, onde necessário,  $\text{H}_2\text{O}$ .



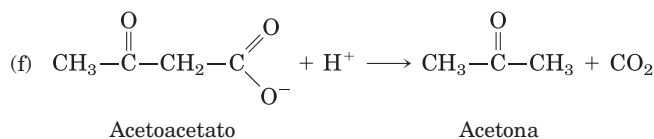
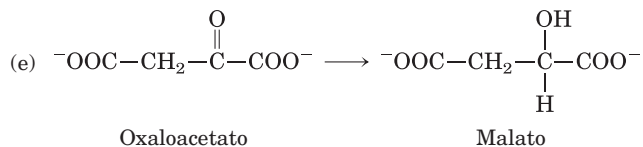
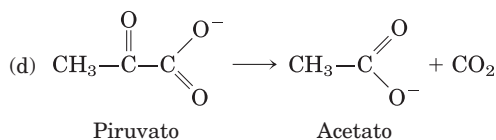
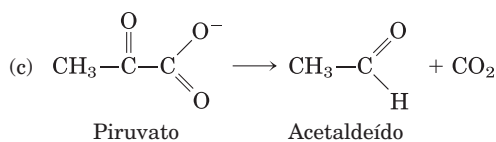
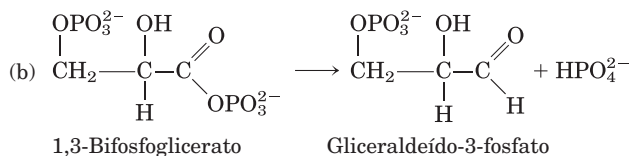
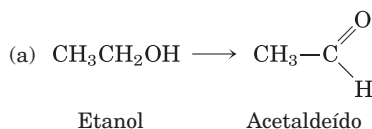


**4. Relação entre a liberação de energia e o estado de oxidação do carbono.** Uma célula eucariótica pode utilizar glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) e ácido hexanoico ( $C_6H_{14}O_2$ ) como combustíveis para a respiração celular. Com base nas fórmulas estruturais, qual substância libera mais energia por grama na combustão completa a  $CO_2$  e  $H_2O$ ?

**5. Coenzimas de nicotinamida como transportadores redox reversíveis.** As coenzimas de nicotinamida (ver Figura 13-24) podem, com os substratos adequados e na presença da desidrogenase apropriada, sofrer reações reversíveis de oxidação-redução. Nessas reações,  $NADH + H^+$  atua como fonte de hidrogênio, como descrito no Problema 3. Sempre que a coenzima for oxidada, o substrato deve ser simultaneamente reduzido:



Para cada uma das reações de (a) a (f), determine se o substrato foi oxidado, reduzido ou se o estado de oxidação não foi alterado (ver Problema 3). Caso uma variação redox tenha ocorrido, equilibre a reação com a quantidade necessária de  $NAD^+$ ,  $NADH$ ,  $H^+$  e  $H_2O$ . O objetivo é reconhecer quando uma coenzima redox é necessária em uma reação metabólica.



**6. Cofatores e mecanismo da piruvato-desidrogenase.** Descreva a função de cada cofator envolvido na reação catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase.

**7. Deficiência de tiamina.** Indivíduos com dieta deficitária em tiamina têm níveis relativamente altos de piruvato na corrente sanguínea. Explique esse fenômeno em termos bioquímicos.

**8. A reação da isocitrato-desidrogenase.** Qual o tipo de reação química envolvido na conversão de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato? Identifique e descreva a função de todos os cofatores. Que outra(s) reação(ões) do ciclo do ácido cítrico é(são) desse mesmo tipo?

**9. Estímulo do consumo de oxigênio por oxaloacetato e malato.** No início dos anos de 1930, Albert Szent-Györgyi publicou a interessante observação de que a adição de pequenas quantidades de oxaloacetato ou malato a suspensões de um macerado do músculo peitoral de pombo estimulava o consumo de oxigênio da preparação. Surpreendentemente, a quantidade de oxigênio consumida era cerca de sete vezes maior do que a quantidade necessária para a oxidação completa (a  $CO_2$  e  $H_2O$ ) do oxaloacetato ou malato adicionado. Por que a adição de oxaloacetato ou malato estimula o consumo de oxigênio? Por que a quantidade de oxigênio consumida era tão maior do que a quantidade necessária para oxidar completamente o oxaloacetato ou malato adicionado?

**10. Formação de oxaloacetato na mitocôndria.** Na última reação do ciclo do ácido cítrico, o malato é desidrogenado para regenerar o oxaloacetato, necessário para a entrada de acetil-CoA no ciclo:



(a) Calcule a constante de equilíbrio a  $25^\circ\text{C}$  para esta reação.

(b) Como o  $\Delta G'^{\circ}$  assume um pH padrão igual a 7, a constante de equilíbrio calculada em (a) corresponde a

$$K'_{\text{eq}} = \frac{[\text{oxaloacetato}][\text{NADH}]}{[\text{L-malato}][\text{NAD}^+]}$$

A medida da concentração de L-malato nas mitocôndrias de fígado de rato é aproximadamente  $0,20 \text{ mM}$  quando  $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$  é igual a 10. Calcule a concentração de oxaloacetato nessas mitocôndrias em pH 7.

(c) Para estimar a magnitude da concentração mitocondrial de oxaloacetato, calcule o número de moléculas de oxaloacetato em uma única mitocôndria do fígado de rato. Assuma que a mitocôndria é uma esfera com  $2,0 \mu\text{m}$  de diâmetro.

**11. Cofatores do ciclo do ácido cítrico.** Suponha que você tenha preparado um extrato mitocondrial que contém todas as enzimas solúveis da matriz, mas que perdeu (por diálise) todos os cofatores de baixa massa molecular. O que você deve adicionar ao extrato para que a preparação oxide acetil-CoA a  $CO_2$ ?

**12. Deficiência de riboflavina.** Como uma deficiência de riboflavina afetaria o funcionamento do ciclo do ácido cítrico? Explique sua resposta.

**13. Conteúdo de oxaloacetato.** Que fatores poderiam diminuir a quantidade de oxaloacetato disponível para a atividade do ciclo do ácido cítrico? Como o oxaloacetato pode ser repostado?

**14. Rendimento energético do ciclo do ácido cítrico.** A reação catalisada pela succinil-CoA-sintetase produz o composto de alta energia GTP. Como a energia livre contida no GTP é incorporada ao conteúdo celular de ATP?



**15. Estudos sobre respiração em mitocôndrias isoladas.**

A respiração celular pode ser estudada em mitocôndrias isoladas pela medida do consumo de oxigênio sob diferentes condições. Se 0,01 M de malonato de sódio é adicionado a mitocôndrias respirando ativamente e utilizando piruvato como fonte de combustível, a respiração rapidamente para e um intermediário metabólico se acumula.

- Qual é a estrutura desse intermediário?
- Explique por que ele se acumula.
- Explique por que o consumo de oxigênio para.
- Além da remoção do malonato, como essa inibição da respiração pode ser superada? Explique.

**16. Estudos com marcação em mitocôndrias isoladas.**

As vias metabólicas dos compostos orgânicos têm sido frequentemente delineadas pelo uso de um substrato marcado radioativamente com o posterior acompanhamento do destino desse marcador.

(a) Como você poderia determinar se a glicose adicionada a uma suspensão de mitocôndrias isoladas é metabolizada a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ?

(b) Suponha que você adicione um breve pulso de  $[3\text{-}^{14}\text{C}]$  piruvato (marcado na posição do metil) às mitocôndrias. Após uma rodada do ciclo do ácido cítrico, qual é a posição do  $^{14}\text{C}$  no oxaloacetato? Explique seguindo o marcador  $^{14}\text{C}$  ao longo da via. Quantas rodadas do ciclo são necessárias para que todo o  $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ piruvato seja liberado na forma de  $\text{CO}_2$ ?

**17. A via do  $\text{CO}_2$  na gliconeogênese.** Na primeira etapa da gliconeogênese, a conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato (PEP), o piruvato é carboxilado pela piruvato-carboxilase a oxaloacetato, depois descarboxilado a PEP pela PEP-carboxicinase (Capítulo 14). Como a adição de  $\text{CO}_2$  é seguida pela perda de  $\text{CO}_2$ , você poderia esperar que, em experimentos com marcadores, o  $^{14}\text{C}$  do  $^{14}\text{CO}_2$  não fosse incorporado ao PEP, glicose ou qualquer outro intermediário da gliconeogênese. Entretanto, pesquisadores observaram que, quando uma preparação de fígado de rato sintetiza glicose na presença de  $^{14}\text{CO}_2$ , o  $^{14}\text{C}$  lentamente aparece no PEP e, no devido tempo, aparece no C-3 e no C-4 da glicose. Como o marcador  $^{14}\text{C}$  é incorporado ao PEP e à glicose? (Dica: Durante a gliconeogênese na presença de  $^{14}\text{CO}_2$ , vários intermediários do ciclo do ácido cítrico com quatro carbonos também se tornam marcados.)

**18. Catabolismo da  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ glicose.** Uma cultura bacteriana respirando ativamente é incubada brevemente com  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ glicose, e os intermediários do ciclo do ácido cítrico e da via glicolítica são isolados. Em que posição está o  $^{14}\text{C}$  em cada um dos intermediários listados abaixo? Considere apenas a incorporação inicial de  $^{14}\text{C}$ , na primeira passagem da glicose marcada pelas vias.

- Frutose-1,6-bisfosfato
- Gliceraldeído-3-fosfato
- Fosfoenolpiruvato
- Acetil-CoA
- Citrato
- $\alpha$ -Cetoglutarato
- Oxaloacetato



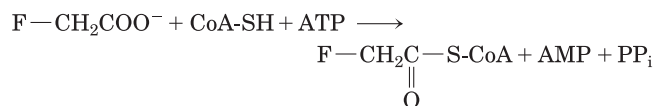
**19. O papel da vitamina tiamina.** Pessoas com beribéri, doença causada pela deficiência de tiamina, apresentam níveis sanguíneos elevados de piruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato, especialmente após consumirem uma refeição rica em glicose. Como esses resultados se relacionam à deficiência de tiamina?

**20. A síntese de oxaloacetato pelo ciclo do ácido cítrico.**

O oxaloacetato é formado na última etapa do ciclo do ácido cítrico pela oxidação do L-malato, dependente de  $\text{NAD}^+$ . A síntese líquida de oxaloacetato a partir de acetil-CoA poderia ocorrer com o uso somente de enzimas e cofatores do ciclo do ácido cítrico, sem o esgotamento dos intermediários do ciclo? Explique. Como o oxaloacetato que é desviado do ciclo (para reações biossintéticas) é repostado?

**21. O esgotamento de oxaloacetato.** O fígado de mamíferos pode efetuar a gliconeogênese utilizando oxaloacetato como material de partida (Capítulo 14). A operação do ciclo do ácido cítrico seria afetada pela intensa utilização de oxaloacetato para a gliconeogênese? Explique sua resposta.

**22. O modo de ação do rodenticida fluoroacetato.** O fluoroacetato, comercialmente preparado para o controle de roedores, também é produzido por uma planta sul-africana. Após entrar na célula, o fluoroacetato é convertido a fluoroacetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima acetato-tiocinase:



O efeito tóxico do fluoroacetato foi estudado em um experimento utilizando o coração isolado e intacto de rato. Após o coração ser perfundido com fluoroacetato 0,22 mM, as taxas medidas de captação de glicose e a glicólise diminuíram, e glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato ficaram acumuladas. O exame dos intermediários do ciclo do ácido cítrico revelou que essas concentrações estavam abaixo do normal, exceto pelo citrato, com uma concentração 10 vezes maior do que o normal.

(a) Onde ocorreu o bloqueio do ciclo do ácido cítrico? O que causou o acúmulo de citrato e o esgotamento dos outros intermediários?

(b) A fluoroacetil-CoA é enzimaticamente transformada pelo ciclo do ácido cítrico. Qual é a estrutura do produto final do metabolismo do fluoroacetato? Por que ele bloqueia o ciclo do ácido cítrico? Como a inibição pode ser superada?

(c) Nos experimentos de perfusão cardíaca, por que a captação de glicose e a glicólise diminuíram? Por que as hexoses monofosfatadas se acumularam?

(d) Por que o fluoroacetato é um veneno letal?

**23. A síntese de L-malato na produção de vinho.** A acidez de alguns vinhos é devida às altas concentrações de L-malato. Escreva uma sequência de reações mostrando como células de leveduras sintetizam L-malato a partir de glicose sob condições anaeróbias na presença de  $\text{CO}_2$  dissolvido ( $\text{HCO}_3^-$ ). Observe que a reação global dessa fermentação não pode envolver o consumo de coenzimas de nicotinamida ou intermediários do ciclo do ácido cítrico.

**24. Síntese líquida de  $\alpha$ -cetoglutarato.** O  $\alpha$ -cetoglutarato desempenha um papel crucial na biossíntese de alguns aminoácidos. Escreva a sequência de reações enzimáticas que poderiam resultar na síntese líquida de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de piruvato. A sequência de reações proposta não deve envolver o consumo líquido de outros intermediários do ciclo do ácido cítrico. Escreva uma equação para a reação global e identifique a fonte de cada reagente.

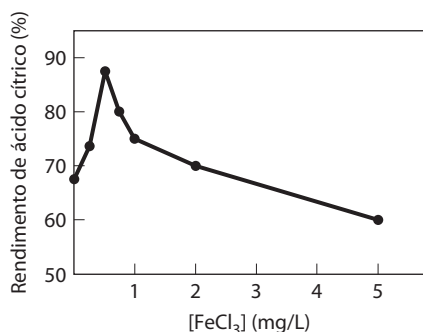
**25. Vias anfibólicas.** Explique, dando exemplos, o significado da afirmação de que o ciclo do ácido cítrico é anfibólico.

**26. Regulação do complexo da piruvato-desidrogenase.**

Nos tecidos animais, a taxa de conversão de piruvato a acetil-CoA é regulada pela razão entre o complexo da PDH ativo e fosforilado, e inativo e desfosforilado. Determine o que acontece com a velocidade desta reação quando uma preparação de mitocôndrias de músculo de coelho contendo o complexo da PDH é tratada com (a) piruvato-desidrogenase-cinase, ATP e NADH; (b) piruvato-desidrogenase-fosfatase e  $\text{Ca}^{2+}$ ; (c) malonato.

**27. A síntese comercial de ácido cítrico.** O ácido cítrico é utilizado como agente flavorizante em refrigerantes, sucos de frutas e em muitos outros alimentos. Ao redor do mundo, o mercado do ácido cítrico está estimado em centenas de milhões de dólares por ano. A produção comercial utiliza o fungo *Aspergillus niger*, que metaboliza a sacarose sob condições cuidadosamente controladas.

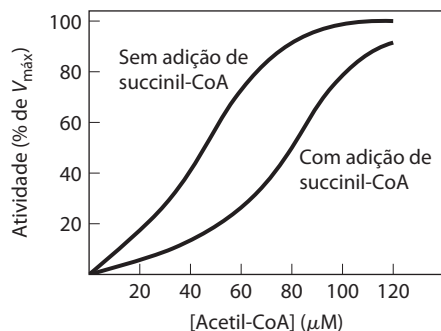
(a) O rendimento de ácido cítrico depende muito da concentração de  $\text{FeCl}_3$  no meio de cultura, como indicado no gráfico. Por que o rendimento decresce quando a concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  está acima ou abaixo do valor ótimo de 0,5 mg/L?



(b) Escreva a sequência de reações pelas quais *A. niger* sintetiza ácido cítrico a partir de sacarose. Escreva uma equação para a reação global.

(c) O processo comercial requer que o meio de cultura seja aerado? Em outras palavras, o processo é uma fermentação ou um processo aeróbio? Explique.

**28. Regulação da citrato-sintase.** Na presença de quantidades saturantes de oxaloacetato, a atividade da citrato-sintase do tecido cardíaco de porco mostra uma dependência sigmoide da concentração de acetil-CoA, como mostrado no gráfico abaixo. Quando succinil-CoA é adicionado, a curva é deslocada para a direita e a dependência sigmoide é mais pronunciada.



Com base nessas observações, sugira como a succinil-CoA regula a atividade da citrato-sintase. (Dica: ver Figura 6-34.) Por que a succinil-CoA é um sinal apropriado para a regulação do

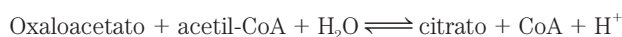
ciclo do ácido cítrico? Como a regulação da citrato-sintase controla a taxa de respiração celular no tecido cardíaco de porco?

**29. Regulação da piruvato-carboxilase.** A carboxilação do piruvato pela piruvato-carboxilase ocorre em uma velocidade muito baixa, a não ser que acetil-CoA, um modulador alostérico positivo, esteja presente. Logo após uma refeição rica em ácidos graxos (triacilgliceróis), mas baixa em carboidratos (glicose), como essa propriedade de regulação desativa a oxidação de glicose a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , mas aumenta a oxidação de acetil-CoA derivada de ácidos graxos?

**30. A relação entre respiração e ciclo do ácido cítrico.** Embora o oxigênio não participe diretamente do ciclo do ácido cítrico, o ciclo somente opera quando  $\text{O}_2$  está presente. Por quê?

**31. O efeito da  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  sobre o ciclo do ácido cítrico.** Como você espera que a operação do ciclo do ácido cítrico responda a um rápido aumento da razão  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  na matriz mitocondrial? Por quê?

**32. A termodinâmica da reação da citrato-sintase nas células.** O citrato é formado pela condensação de acetil-CoA e oxaloacetato, catalisada pela citrato-sintase:



Em mitocôndrias de coração de rato, a pH 7 e 25°C, as concentrações de reagentes e produtos são: oxaloacetato, 1  $\mu\text{M}$ ; acetil-CoA, 1  $\mu\text{M}$ ; citrato, 220  $\mu\text{M}$ ; e CoA, 65  $\mu\text{M}$ . A variação de energia livre padrão da reação da citrato-sintase é -32,2 kJ/mol. Qual é o sentido do fluxo de metabólitos na reação da citrato-sintase nas células cardíacas de rato? Explique.

**33. As reações do complexo da piruvato-desidrogenase.** Duas das etapas da descarboxilação oxidativa do piruvato (etapas 4 e 5 na Figura 16-6) não envolvem nenhum dos três carbonos do piruvato, ainda que eles sejam essenciais para o funcionamento do complexo da PDH. Explique.

**34. Mutantes do ciclo do ácido cítrico.** Existem muitos exemplos de doenças humanas nas quais uma ou outra atividade enzimática está ausente devido a mutações genéticas. Entretanto, doenças nas quais indivíduos careçam de uma das enzimas do ciclo do ácido cítrico são extremamente raras. Por quê?

**35. Partição entre os ciclos do ácido cítrico e do glioxilato.** Em um organismo (como *E. coli*) que tem o ciclo do ácido cítrico e o ciclo do glioxilato, o que determina em qual dessas vias o isocitrato entrará?

## Problema de análise de dados

**36. Como o ciclo do ácido cítrico foi determinado.** A bioquímica detalhada do ciclo do ácido cítrico foi determinada por diversos pesquisadores ao longo de décadas. Em um artigo de 1937, Krebs e Johnson resumiram seu trabalho e o trabalho de outros na primeira descrição publicada dessa via.

Os métodos utilizados por esses pesquisadores eram muito diferentes dos da bioquímica moderna. Marcadores radioativos não estavam comumente disponíveis até os anos de 1940, de modo que Krebs e outros pesquisadores tiveram que utilizar técnicas sem marcadores para elucidar a via. Utilizando amostras frescas de músculo peitoral de pombo, eles determinaram o consumo de oxigênio preparando uma suspensão do músculo macerado em tampão em um frasco lacrado, e medindo

o volume (em  $\mu\text{L}$ ) de oxigênio consumido sob diferentes condições. Eles mediram os níveis de substratos (intermediários) tratando as amostras com ácido para a remoção das proteínas contaminantes, e a seguir dosaram as quantidades de várias moléculas orgânicas pequenas. As duas observações-chave que levaram Krebs e colaboradores a proporem o *ciclo* do ácido cítrico, em vez de uma *via linear* (como a glicólise), foram feitas nos seguintes experimentos.

*Experimento I.* Eles incubaram 460 mg de músculo macerado em 3 mL de tampão a 40°C por 150 minutos. A adição de *citrato* aumentou o consumo de  $\text{O}_2$  em 893  $\mu\text{L}$  em comparação com as amostras sem citrato. Eles calcularam, com base no consumo de  $\text{O}_2$  durante a respiração de outros compostos contendo carbono, que o consumo de  $\text{O}_2$  esperado para a respiração completa desta quantidade de citrato seria de apenas 302  $\mu\text{L}$ .

*Experimento II.* Eles mediram o consumo de  $\text{O}_2$  por 460 mg de músculo macerado em 3 mL de tampão quando incubado com *citrato* e/ou *1-fosfoglicerol* (glicerol-1-fosfato, o qual sabia-se ser prontamente oxidado pela respiração celular) a 40°C por 140 minutos. Os resultados estão mostrados na tabela.

Amostra	Substrato(s) adicionado(s)	$\mu\text{L}$ de $\text{O}_2$ absorvidos
1	Sem substrato extra	342
2	0,3 mL de 0,2 M 1-fosfoglicerol	757
3	0,15 mL de 0,02 M citrato	431
4	0,3 mL de 0,2 M 1-fosfoglicerol e 0,15 mL de 0,02 M citrato	1.385

(a) Por que o consumo de  $\text{O}_2$  é uma boa medida da respiração celular?

(b) Por que a amostra 1 (tecido muscular não suplementado) consome oxigênio?

(c) Com base nos resultados das amostras 2 e 3, você pode concluir que 1-fosfoglicerol e citrato atuam como substratos para a respiração celular neste sistema? Explique seu raciocínio.

(d) Krebs e colaboradores utilizaram estes experimentos para argumentar que o citrato era “catalítico” – isto é, que auxiliava as amostras de tecido muscular a metabolizar o 1-fosfoglicerol de forma mais completa. Como você utilizaria os resultados deles para aprofundar esse argumento?

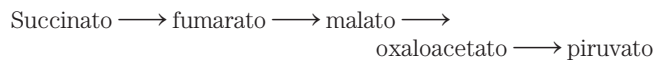
(e) Krebs e colaboradores também argumentaram que o citrato não era simplesmente consumido, mas deveria ser *regenerado*. Portanto, as reações deveriam formar um *ciclo* em vez de uma via linear. Como você aprofundaria esse argumento?

Outros pesquisadores haviam observado que o *arsenato* ( $\text{AsO}_4^{-3}$ ) inibia a  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase e que o *malonato* inibia a succinato-desidrogenase.

(f) Krebs e colaboradores observaram que as amostras de tecido muscular tratadas com arsenato e citrato consumiriam o citrato apenas na presença de oxigênio e, sob essas condições, oxigênio seria consumido. Com base na via da Figura 16-7, a que molécula o citrato era convertido neste experimento, e por que as amostras consumiam oxigênio?

Em seu artigo, Krebs e Johnson também relataram o seguinte. (1) Na presença de arsenato, 5,48 mmol de citrato eram convertidos a 5,07 mmol de  $\alpha$ -cetoglutarato. (2) Na presença de malonato, o citrato era quantitativamente convertido a grandes quantidades de succinato e pequenas quantidades de  $\alpha$ -cetoglutarato. (3) A adição de oxaloacetato na ausência de oxigênio levava à produção de uma grande quantidade de citrato; essa quantidade era aumentada quando glicose também fosse adicionada.

Outros pesquisadores haviam descoberto a seguinte rota em preparações similares de tecido muscular:



(g) Com base somente nos dados apresentados neste problema, qual é a ordem dos intermediários no ciclo do ácido cítrico? Como isso se compara à Figura 16-7? Explique seu raciocínio.

(h) Por que era importante mostrar a conversão *quantitativa* de citrato a  $\alpha$ -cetoglutarato?

O artigo de Krebs e Johnson também apresenta outros resultados que elucidaram a maioria dos componentes ausentes do ciclo. O único componente que ficou indeterminado foi a molécula que reage com oxaloacetato para formar citrato.

### Referência

**Krebs, H.A. & Johnson, W.A.** (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**, 148–156. (Reimpresso [1980] em *FEBS Lett.* **117** [Suppl.], K2–K10.)

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.